

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

## SUR LA PROPHYLAXIE DE LA SYPHILIS

*Rapport fait au XII<sup>e</sup> Congrès international d'hygiène de Berlin.*

PAR ÉLIE METCHNIKOFF

Invité par l'estimé président de notre section à vous faire un rapport sur la syphilis, j'ai l'honneur de vous entretenir des recherches que nous avons faites avec M. le Dr Roux, en collaboration avec M. le Dr Salmon.

Depuis le rapport que nous avons présenté au Congrès de Bruxelles en 1903, nos études expérimentales ont été dirigées principalement vers la découverte de quelque moyen pratique pour empêcher l'élosion de la syphilis après l'infection par le virus.

Les tentatives pour préparer soit un sérum antisyphilitique efficace, soit un vaccin ne contenant pas de virus vivant ayant échoué, nous avons étudié, M. Roux et moi, l'action prophylactique des pommades à base de mercure. Les résultats positifs que nous avons obtenus ayant déjà été communiqués au Congrès de Dermatologie à Berne, en 1906, et publiés dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, en 1905 et 1906, nous nous bornerons à les résumer en quelques mots.

Nous avons établi que, parmi les pommades à base de mercure que nous avons expérimentées sur les singes, ce sont les pommades qui contiennent 25 à 33 0/0 de calomel pour 75 0/0 ou 67 0/0 de lanoline qui nous ont donné les meilleurs résultats.

Aux faits que nous avons exposés dans les mémoires mentionnés, nous pouvons ajouter toute une série de nouvelles expériences qui confirment pleinement le rôle préventif de la pommade au calomel convenablement préparée.

On nous a fait observer que les pommades qui contiennent une si grande quantité de lanoline manquent d'onctuosité, surtout en hiver lorsqu'elles sont exposées au froid. Dans le but de les rendre plus molles, nous avons modifié leur composition en ajoutant soit de la vaseline, soit de l'huile de pied de veau. Pour diminuer la quantité de préparation mercurielle, nous avons essayé de remplacer le calomel par des doses moindres de précipité blanc.

Sans entrer dans le détail de ces expériences, nous nous contenterons d'en

communiquer le résultat. L'addition d'un dixième de vaseline à la pommade au calomel, dont nous avons donné la formule, n'empêche d'aucune façon son action préventive, tandis que toutes les autres modifications que nous avons tentées lui ont fait perdre son efficacité. Nous n'avons pas eu plus de succès avec une pommade au nitrate d'argent, que nous avons essayée dans l'espoir d'empêcher en même temps la syphilis et la blennorrhagie.

Nous insistons sur l'emploi de la pommade contenant 33 grammes de calomel, 67 grammes de lanoline pure et 10 grammes de vaseline. Cette pommade est plus onctueuse que nos pommades originelles, bien qu'elle ne soit pas encore aussi molle qu'il le faudrait. Seulement, en présence des essais infructueux faits avec d'autres préparations, nous pensons que l'inconvénient de sa consistance trop grande ne doit point s'opposer à l'emploi préventif de la pommade dont nous venons de donner la formule. En plein hiver il n'y a qu'à la maintenir à l'abri du froid afin qu'elle garde suffisamment de souplesse pour être employée avantageusement.

Après le grand nombre de résultats favorables sur des singes, auxquels est venu s'ajouter une expérience concluante faite sur M. le Dr Maisonneuve qui a échappé à la syphilis grâce à l'emploi de la pommade au calomel appliquée une heure après une inoculation massive de virus, on aurait pu croire que la prophylaxie de la syphilis pénétrerait facilement dans la pratique courante. En réalité, elle a rencontré de vives objections de la part de plusieurs syphiligraphes. D'abord on lui a opposé les recherches expérimentales de M. le professeur Neisser et de ses collaborateurs de Batavia d'après lesquelles l'emploi de la pommade au calomel aurait donné autant d'insuccès que de succès. Mais, ainsi qu'il résulte de la communication de M. Neisser, faite au Congrès de Berne en septembre 1906, ses résultats négatifs se rapportent aux expériences dans lesquelles il avait employé des pommades « Kalomel-Kochsalzsalbe » et « Kalomel-Wassersalbe » qui ne contenaient que 10 0/0 de calomel. Ces résultats, au lieu de contredire les nôtres, se trouvent en parfaite harmonie avec eux et démontrent une fois de plus que les pommades qui contiennent moins de 25 0/0 de calomel sont inefficaces.

Malgré ces faits et malgré que M. Neisser recommande lui-même l'emploi préventif d'une pommade à 30 0/0 de calomel, quelques syphiligraphes continuent à le citer comme adversaire de notre méthode. D'autres insistent sur l'insuffisance de nos expériences et sur les résultats négatifs de quelques observations sur l'homme. Aux deux cas insuffisamment étudiés par MM. Gaucher et Lévy Bing, dont nous avons fait la critique dans le cinquième mémoire sur la syphilis que nous avons publié, M. Roux et moi, il est venu s'en ajouter un troisième. Nous en avons eu connaissance par les Annales des maladies vénériennes où nous avons trouvé un article intitulé : « Sur un nouveau cas de syphilis malgré l'emploi de la pommade au calomel ». Il s'agit « d'un Péruvien de passage à Paris, qui, confiant dans l'efficacité de la pommade au calomel, avait cru pouvoir, sans danger, profiter largement de son séjour dans la capitale. Malgré ce moyen prophylactique, il fut contaminé. » Nous n'avons trouvé aucun renseignement sur la composition de cette « pommade au calomel » restée sans effet.

Persuadés que, pour être efficace, la pommade doit correspondre à notre formule et désireux de nous rendre compte des pommades que le client peut trouver chez les pharmaciens, nous avons prié un de nos amis de nous procurer quelques-unes de ces préparations provenant de plusieurs pharmacies de Paris. Nous en avons ainsi reçu toute une collection que nous avons soumise à l'épreuve. La personne de confiance demandait aux pharmaciens de la pommade préventive contre la syphilis. Quelques-uns renvoyaient le client, affirmant qu'une telle pommade n'existe pas ; d'autres fournissaient la pommade du Codex dont le simple aspect était tout différent de la vraie pommade préventive et qui contenait 40 0/0 de calomel et 90 0/0 de vaseline. Un pharmacien donna à notre envoyé une pommade étiquetée « Pommade de Metchnikoff » qui ne contenait que 9 0/0 de calomel, d'après l'analyse faite par M. Villa, préparateur à l'Institut Pasteur. Plusieurs pharmaciens ont lancé des spécialités, sous différents titres, préconisant leur effet préventif contre la syphilis et citant abusivement nos noms ou celui de l'Institut Pasteur. Quelques-unes de ces préparations correspondaient à notre formule, andis que d'autres lui étaient absolument étrangères.

Il n'est guère étonnant que, dans ces conditions, des personnes qui usent de ces pommades au calomel inefficaces soient atteintes de syphilis. Seulement, au lieu de démontrer l'inutilité de la méthode, ces exemples ne font que démontrer la défectuosité de sa mise en pratique.

Puisque la prophylaxie de la syphilis par la pommade au calomel repose sur des faits expérimentaux rigoureusement établis, il n'y a aucune possibilité de la mettre sérieusement en doute. Seulement, cette méthode n'ayant d'efficacité que si elle est employée dans les quelques heures qui suivent le contact infectieux, elle peut rester impuissante dans certains cas. Il nous est arrivé de recevoir les doléances de personnes venant de constater qu'elles avaient été en contact avec des individus syphilitiques plusieurs jours auparavant. A leur question : dans ces conditions, la pommade au calomel peut-elle encore être utile ? nous répondions naturellement par la négative. Mais, persuadés que des exemples pareils sont loin d'être rares dans la vie courante, nous avons cherché quelque moyen préventif, capable d'empêcher l'élosion de la syphilis à un moment où la pommade au calomel n'a plus d'action.

Après que M. Uhlenhuth eut démontré l'efficacité de la préparation arsénicale, connue sous le nom d'Atoxyl, dans les infections spiriliennes des animaux, et que M. le Dr Salmon eut fait connaître les premiers succès obtenus avec ce médicament dans le traitement des accidents syphilitiques, il était tout naturel de se demander si l'Atoxyl n'avait pas la propriété d'en empêcher la syphilis plus ou moins longtemps après l'infection.

Profitant de l'expérience de M. Salmon dans le maniement de l'Atoxyl, nous nous sommes associés avec lui pour exécuter plusieurs séries d'expériences sur le rôle prophylactique de cette préparation. Indépendamment de nous, cette question a été étudiée par MM. Uhlenhuth, Hoffmann et Roscher qui ont soumis des singes, aussitôt après les avoir inoculés avec du virus syphilitique, aux injections répétées d'Atoxyl. Huit animaux traités de cette façon restèrent indemnes. Mais, comme quelques-uns des témoins, qui

n'avaient pas reçu d'atoxyl, ne manifestèrent pas non plus d'accidents syphilitiques, les savants nommés se sont gardés de tirer de leur expérience une conclusion définitive. Dans son rapport sur l'étiologie de la syphilis, présenté à ce congrès, M. Hoffmann considère comme « encourageants » les résultats obtenus sur la prophylaxie à l'aide de l'atoxyl.

Dans notre première expérience, deux macaques javanais ont subi le traitement par des doses répétées d'atoxyl après l'inoculation du virus syphilitique, faite aux arcades sourcilières. Le premier de ces singes a reçu la première dose de 15 centigrammes le jour même de l'inoculation. Il en reçut encore 5 autres dans l'espace de 17 jours, ce qui a fait au total une quantité de 90 centigrammes. Pour un animal qui ne pesait pas 5 livres (2,360 grammes) elle était trop forte car, déjà après la deuxième injection, il manifesta une paralysie passagère des pattes postérieures. Par contre, le second macaque ne reçut en tout que 30 centigrammes en 4 injections, dont la première n'était pratiquée que le huitième jour après l'inoculation.

Les deux singes, étant restés définitivement indemnes de tous accidents syphilitiques, cette expérience nous démontre la possibilité de prévenir ceux-ci par l'atoxyl. Cinq autres macaques (3 javanais et 2 rhésus), inoculés avec les mêmes virus, ont accusé des chancres typiques aux endroits inoculés. Deux de ces témoins n'avaient subi aucun traitement, tandis que 3 autres avaient été traités avec des pommades autres que celle que nous recommandons pour la prophylaxie de la syphilis. Malgré ce traitement, les 3 macaques ont été pris de chancres des plus typiques.

Afin d'établir si l'élosion de la syphilis pouvait être empêchée par des doses plus faibles d'atoxyl, un macaque bonnet chinois ne reçut en tout que 20 centigrammes, répartis en 4 injections, faites pendant les premiers jours après l'inoculation du virus. Cette fois encore le résultat a été positif, c'est-à-dire que le singe resta indemne, tandis que ses 3 témoins contractèrent le chancre syphilitique.

Cette expérience ayant démontré que des doses relativement faibles d'atoxyl suffisaient déjà pour empêcher la syphilis, nous en avons fait une autre dans laquelle nous nous sommes contentés d'une seule injection d'atoxyl. Un macaque rhésus de 3 kilos, inoculé avec du virus aux arcades sourcilières, resta indemne à la suite d'une injection de 15 centigrammes d'atoxyl faite le huitième jour après l'inoculation. Trois témoins, dont un rhésus, un papion et un javanais, contractèrent la maladie.

Comme le rhésus est, parmi les macaques, le moins sensible à la syphilis, on pouvait supposer que l'immunité, dans notre expérience, était due non pas à l'action de l'atoxyl, mais simplement à un certain degré de résistance naturelle; aussi, dans une autre expérience, nous avons pris 4 bonnets chinois dont 3 furent soumis au traitement et un seul gardé comme témoin. Le premier de ces animaux avait reçu 15 centigrammes d'atoxyl le lendemain, le second reçut la même dose le quinzième jour après l'inoculation du virus. Le troisième, un gros macaque de 3 kilos, ne fut injecté qu'avec 10 centigrammes et ceci 15 jours après l'inoculation des produits syphilitiques. Seul le témoin accusa un chancre induré, 34 jours après le début de l'expérience.

Dans le but d'établir la dose minima d'atoxyl capable d'empêcher la

syphilis, un rhésus ne reçut que 25 miligrammes. Cette fois le résultat a été négatif, car le singe contracta l'accident primaire.

Après avoir établi qu'introduit sous la peau l'atoxyl empêche l'élosion du chancre, même lorsqu'il n'a été injecté qu'une seule fois 2 semaines après l'inoculation, à la dose relativement faible de 33 milligrammes par kilo l'animal, il a fallu rechercher la limite pendant laquelle s'exerce encore son action préventive. Dans cette intention, un bonnet chinois reçut une injection de 40 centigrammes tout à fait au début de son accident primaire. Le chancre a été arrêté pendant un moment, mais ne tarda pas à présenter une récidive.

Pour compléter l'étude de la prophylaxie par l'atoxyl, 2 macaques, ayant été auparavant traités à titre préventif avec succès, furent soumis à une nouvelle infection, non suivie de traitement. Un de ces animaux, inoculé 77 jours, et un autre, inoculé 91 jours après la première inoculation, contractèrent tous les deux l'accident primaire caractéristique. Cette expérience démontre qu'à la suite de la première inoculation il n'y a eu ni généralisation du virus, ni immunité consécutive.

Dans la prophylaxie des maladies infectieuses, plus une méthode est simple, plus elle a de chances d'être appliquée : nous avons donc recherché si l'absorption de l'atoxyl par la bouche suffirait pour empêcher l'élosion de la syphilis. Nos multiples tentatives n'ont donné que des résultats trop imparfaits pour qu'il soit nécessaire d'en parler longuement.

Autant les injections sous-cutanées d'atoxyl sont efficaces et inoffensives, à moins d'employer des doses trop fortes, autant l'ingestion de l'atoxyl est sujette à caution.

Le but principal de nos expériences sur les singes était de savoir si l'emploi de l'atoxyl pouvait être de quelque utilité pour la prévention de la syphilis à une période où les pommades au calomel n'ont plus d'action. Le fait qu'une seule injection, pratiquée jusqu'à 45 jours après l'inoculation du virus, empêche l'infection, présente déjà une grande importance. Mais surgit la question de la toxicité de l'atoxyl, qui a tant attiré l'attention de la part des médecins qui manient ce médicament. Si cette préparation arsénicale menace sérieusement la vie, on comprend qu'on hésite à l'employer, surtout dans un but prophylactique. Si les doses suffisantes pour les singes doivent servir de base pour calculer la quantité d'atoxyl que l'on doit injecter à un homme, il en faudrait environ 2 grammes pour une personne de 60 kilos. Seulement, comme des quantités moins fortes suffisent déjà pour guérir les accidents syphilitiques déclarés, il faut croire que la prophylaxie pourrait être obtenue avec des doses encore plus faibles. M. Hallopeau, qui a la plus grande expérience dans le traitement de la syphilis par l'atoxyl, recommande une injection de 75 centigrammes, suivie d'une seconde injection de 60 centigrammes et d'une troisième de 30, ce qui fait en tout 165 centigrammes. Dans aucun cas d'un pareil traitement il n'a observé de phénomènes d'intolérance et d'intoxication.

Dans une de nos expériences, un macaque rhésus n'avait reçu que 5 centigrammes d'atoxyl, le onzième jour après l'inoculation du virus. Il mourut 46 jours après sans aucune manifestation syphilitique. Bien que ce délai

ne soit pas encore absolument définitif, car nous avons vu des incubations de plus de 50 jours, il reste néanmoins très probable qu'une dose de 5 centigrammes pour un singe de plus de 2 kilos suffit pour empêcher l'élosion de la syphilis.

Avant d'avoir pu répéter cette expérience, nous avons été mis dans la nécessité d'en faire une application chez l'homme. Un homme de haute culture intellectuelle s'est présenté chez nous très inquiet à la suite d'un contact suspect ayant eu lieu 5 jours auparavant. A notre question : Pourquoi ne vous êtes pas servi de la pommade au calomel ? il nous a répondu que ce moyen préventif lui était absolument inconnu et qu'en général le public l'ignore. Dans son état de grande anxiété il nous priaït instamment de le soumettre à un traitement préventif par l'atoxyl. Bien qu'il ne fût pas possible d'établir d'une façon précise si le contact suspect faisait courir au patient un danger réel, M. le Dr Salmon, se basant sur les expériences avec les singes, se décida tout de même à faire au personnage en question 2 injections sous-cutanées d'atoxyl, de 50 centigrammes chacune, à 2 jours d'intervalle. Ce traitement a relevé l'état moral du patient qui est resté indemne de tout accident syphilitique et qui ne manifesta non plus aucun symptôme d'intoxication.

Dans le second cas, M. Salmon a eu affaire à un neurasthénique qui ne dormait plus et désirait à tout prix être traité préventivement dans la crainte d'avoir été infecté par la syphilis. Il reçut 2 injections de 50 centigrammes d'atoxyl sans la moindre intolérance. Nous ne voulons, bien entendu, tirer aucune conclusion de ces deux observations.

Il y a lieu d'espérer que, dans l'avenir, lorsqu'on sera en possession de préparations arsénicales moins toxiques que l'atoxyl et cependant efficaces contre la syphilis, on pourra prévenir celle-ci, pendant la période d'incubation, longtemps après que la pommade au calomel n'a plus d'action. Les expériences qui peuvent mener à ce résultat sont en train. Mais pour le moment, tant qu'elles ne sont encore qu'à la période d'essai, c'est la prévention par la pommade au calomel, dès les premières heures après le contact infectieux, qui doit être placée au premier plan.

L'efficacité si remarquable de cette pommade, ainsi que celle des injections sous-cutanées d'atoxyl sur les singes, indique que le virus syphilitique, pendant une grande partie de sa longue incubation, ne s'adapte que difficilement à l'organisme. Nous avons examiné la sérosité extraite des endroits de l'inoculation chez un chimpanzé et chez deux macaques, pendant la période d'incubation au moyen de l'ultracondensateur de Reichert, qui permet de distinguer très facilement les spirilles syphilitiques sur un fond noir et fournit le meilleur moyen pour révéler la présence de ces microbes même en quantité minime. Eh bien, malgré ces conditions si favorables, nous n'avons pas pu déceler la présence des spirilles de Schaudinn pendant les 45 jours qui ont suivi l'inoculation du virus. Ce fait montre que les spirilles mettent un temps très long avant de se reproduire en quantité appréciable. Et c'est pour cette raison que la prophylaxie de la syphilis est relativement simple et facile. Ce qui est plus difficile, c'est d'en convaincre le public et cela pour des raisons dont quelques-unes ont été signalées plus haut. Cet exemple du

traitement préventif de la syphilis montre une fois de plus l'utilité de la différenciation de l'hygiène des autres branches de la médecine, notamment de la thérapeutique.

Les progrès de l'hygiène rationnelle imposent aux médecins le devoir d'apprendre aux gens bien portants les moyens de conserver intacte leur santé. Nulle part, mieux que dans les maladies vénériennes, ce but prophylactique peut être atteint.

# Recherches sur le cancer expérimental des souris

PAR J. BRIDRÉ

(Travail du laboratoire de M. Borrel.)

---

Les expériences que nous avons entreprises depuis deux ans ont eu pour principal but l'immunisation des souris contre l'inoculation d'une tumeur facilement transplantable.

Si nous nous servons, dans l'exposé de ces recherches, des termes d'immunité, de virulence, d'inoculation, de vaccination, nous ne voulons nullement préjuger ici de la nature étiologique des tumeurs cancéreuses et donner à ces expressions le sens précis qu'elles ont en bactériologie. Le mot *immunité* pourrait être remplacé — comme le désirent Bashford, Murray et Cramer<sup>1</sup> — par celui de *résistance*. La *virulence* d'une tumeur indique seulement la faculté que cette tumeur possède de se développer dans l'organisme des animaux auxquels on l'inocule; pour les partisans de la théorie cellulaire, elle marquerait plutôt le *degré de vitalité* des cellules du tissu inoculé. L'*inoculation* d'un cancer est, en réalité, une *greffe* ou une *bouture*. Enfin, si nous parlons de *souris vaccinées*, il s'agira de souris ayant subi une préparation devant leur procurer une certaine résistance vis-à-vis de l'inoculation d'une tumeur virulente.

Des expériences d'inoculation ont été possibles à partir du moment où l'on a eu une tumeur facilement inoculable et avec un fort pourcentage de succès. C'est le cas de la tumeur B.

## INOCULATIONS EN SÉRIES DE LA TUMEUR B.

La tumeur B est un adéno-carcinôme qui se distingue des tumeurs du même genre connues jusqu'à présent, par la forme

1. B., M., et Cr., The natural and induced Resistance of mice to the growth of cancer, *Proceed. Roy. soc.* T. LXXIX, 1907.

cylindrique de ses cellules. Les figures 1 et 2 montrent, mieux que ne pourrait le faire toute description, la constitution de cette tumeur.

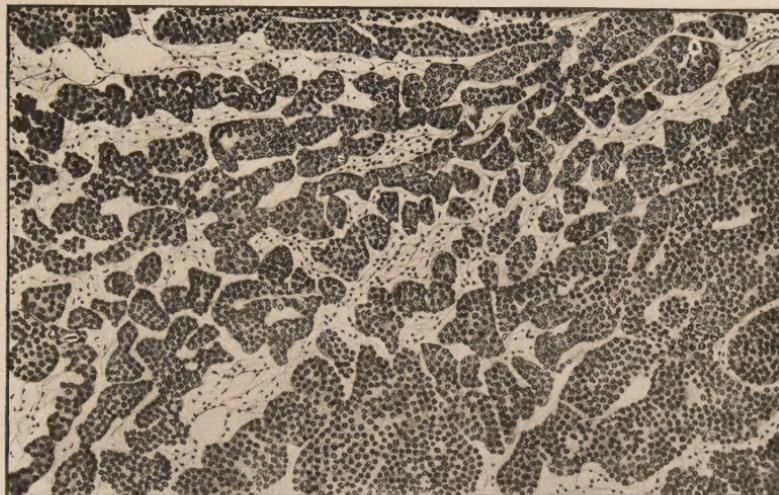


Fig. 1. — Tumeur B à un faible grossissement. Type glandulaire très net.

**MANUEL OPÉRATOIRE DES INOCULATIONS.** — Toutes les inoculations ont été pratiquées au moyen d'aiguilles creuses d'un diamètre de



Fig. 2. — La même tumeur à un fort grossissement, l'épithélium est à cellules cylindriques.

2 mm. avec mandrin formant piston, sortes de trocarts dont la canule est taillée en biseau et la tige mousse.

Les aiguilles sont stérilisées avant chaque inoculation.

Un petit fragment de tissu cancéreux étant introduit dans l'aiguille par aspiration, l'aiguille est glissée sous la peau de la souris, depuis l'aîne jusqu'à l'aisselle ; à l'aide du mandrin, on pousse le fragment de cancer, puis on retire l'aiguille. A cause de l'élasticité du tissu conjonctif sous-cutané, le fragment de tumeur, qui paraissait avoir été chassé sous l'aisselle, se trouve alors sur le côté du thorax, en arrière de l'épaule. Dans le long trajet qu'elle parcourt, l'aiguille se débarrasse des souillures qu'elle a pu contracter en traversant le poil et la peau, et le fragment inoculé reste aseptique.

Nous avons adopté cette façon d'opérer parce qu'elle nous a donné le plus grand nombre de succès. Pour qu'une inoculation soit positive, il faut — outre la virulence de la tumeur et la réceptivité de l'animal inoculé, conditions essentielles, — que les fragments de cancer soient assez volumineux. Des cellules isolées, même entières et vivantes en suspension dans l'eau, ne donnent pas de résultats positifs.

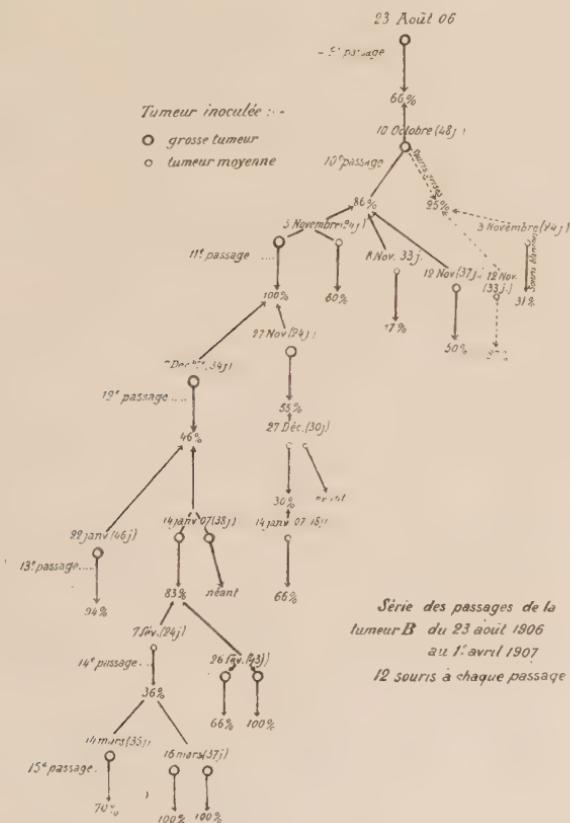
DÉVELOPPEMENT DE LA TUMEUR INOCULÉE. — La tumeur d'inoculation se développe généralement vite ; elle atteint souvent, en 8 jours, la grosseur d'un pois, et, en 15 jours, le volume d'une noisette ; des tumeurs de trois semaines peuvent peser 8 grammes et plus. Lorsqu'une certaine dimension est atteinte (grosse amande verte), il se forme des kystes, la tumeur adhère à la peau et s'ulcère : la souris meurt d'infections secondaires.

Il est rare de voir des tumeurs se développer, passé le délai de 3 semaines que nous avons adopté pour les pourcentages. Nous avons observé, toutefois, un cas de *croissance tardive* qui mérite d'être signalé : une souris inoculée en mai 1905, sur le côté droit du thorax, avait été mise à part, en compagnie d'autres souris « n'ayant pas pris » à la même inoculation ; le 14 février 1906, huit mois plus tard, on constate, chez cette souris, une petite tumeur de la grosseur d'une lentille au point d'inoculation. Après biopsie pratiquée le 23 février, l'examen histologique montre que la tumeur appartenait bien au type B. (Il ne s'agissait pas d'une tumeur spontanée.)

Les *métastases*, si fréquentes dans les inoculations de tumeur

Jensen sur les souris parisiennes<sup>1</sup> et dans les inoculations de tumeur du type R (tumeur de Paris<sup>2</sup>), n'ont jamais pu être observées ici avec la tumeur B, malgré le nombre considérable de souris cancéreuses autopsiées.

**CHOIX DES SOURIS.** — Nous employons, comme sujets d'expériences, des souris adultes de 20 grammes environ, et, de préférence, des mâles. *la faible proportion d'inoculations positives fournie par les femelles pleines pouvant être une cause d'erreur dans les résultats.*



**POURCENTAGE DES INOCULATIONS POSITIVES ; VARIATIONS DE LA VIRULENCE.** — La proportion des inoculations positives est établie trois semaines après l'inoculation.

1 A. BORREL et HAALAND, Tumeurs de la souris, *Soc. de biologie*, 1905.

2 M. HAALAND, Les tumeurs de la souris, *Ces Annales*, mars 1905, t. XXI, p. 136.

Les premières inoculations de la tumeur B donnèrent 30 à 40 % de succès, proportion énorme si on la compare à celle qui avait été obtenue avec les tumeurs étudiées jusqu'alors.

Les passages successifs augmentèrent la proportion d'inoculations positives, qui atteignit 80 et même 100 %; puis, au 8<sup>e</sup> passage, elle tomba à 30 %. De semblables *variations de virulence* sont très fréquentes: l'arbre de descendance (page 763) d'une tumeur de 8<sup>e</sup> passage montre quelques-unes de ces variations et permet de faire les remarques suivantes:

1<sup>o</sup> Des tumeurs de même passage (10<sup>e</sup>, 12<sup>e</sup>) peuvent fournir, à l'inoculation, des proportions très différentes de cas positifs;

2<sup>o</sup> L'âge et le volume des tumeurs ne paraissent pas avoir d'influence précise sur les résultats des inoculations. (Inoculations du 27 décembre, du 22 janvier, etc.)

Nous devons dire, cependant, que le plus grand nombre de succès a été fourni par des tumeurs âgées de 20 jours au moins, et présentant une tendance à former des kystes. Il paraît indifférent d'inoculer telle ou telle partie de la tumeur;

3<sup>o</sup> Enfin, *la race des souris* a une grande importance: les souris grises donnent une proportion de succès très inférieure à celle qui est fournie par les souris blanches; et *le passage chez les souris grises atténue la virulence de la tumeur pour les souris blanches*.

En résumé, chaque tumeur expérimentale possède un virulence propre, individuelle, vis-à-vis des souris de même race, et appréciable uniquement par l'inoculation.

## RECHERCHES SUR L'IMMUNITÉ ANTI-CANCÉREUSE

### 1<sup>o</sup> VACCINATION PAR TISSU CANCÉREUX FRAIS

a) *Souris ayant résisté à une première inoculation.* — Pour Ehrlich<sup>1</sup>, des souris qui ont subi sans succès l'inoculation d'une tumeur virulente ne prennent qu'exceptionnellement une tumeur à une deuxième inoculation: elles sont vaccinées par la première épreuve.

Nos expériences nous ont donné des résultats notamment différents de ceux d'Ehrlich: ils se rapprochent plutôt de ceux qu'a obtenus Michaelis.

1. P. EHRLICH, Experimentelle Karzinomstudien an Mausen. *Zeitschrift für ärztliche Fortbildung*. Troisième année, 1906, n° 7.

Exemples : 1<sup>o</sup> Sur 14 souris inoculées sans succès, en octobre 1905, avec une tumeur qui avait donné 50 0/0 de cas positifs, et réinoculées le 9 février 1906, 7 ont pris des tumeurs, soit 50 0/0. Souris neuves témoins : 80 0/0 de tumeurs ;

2<sup>o</sup> Sur 10 souris inoculées sans résultat, le 4 janvier 1906, avec une tumeur donnant 60 0/0 de succès, 3 prennent des tumeurs à l'inoculation du 9 février, soit 33 0/0. Témoins : 80 0/0 ;

3<sup>o</sup> Sur 63 souris inoculées sans succès le 27 novembre 1906, avec une tumeur ayant fourni 55 0/0 de cas positifs, 2 prennent des tumeurs à une inoculation pratiquée le 27 décembre ; soit 3 0/0. Témoins : 8 0/0.

A quoi tiennent de telles différences dans les résultats obtenus par les divers expérimentateurs ? On pourrait objecter, en ce qui concerne les résultats d'Ehrlich, que des souris, qui ont résisté à l'inoculation d'une tumeur très virulente donnant 80 à 90 0/0 de succès, ont manifesté une résistance naturelle considérable, et qu'il n'y a rien de surprenant à ce qu'elles résistent de même à une deuxième inoculation ; cette dernière épreuve négative ne prouverait pas qu'il y a eu vaccination ; il pourrait y avoir eu simplement une sélection établie parmi les souris.

Dans cette hypothèse, les expériences 1 et 2, relatées ci-dessus, seraient explicables : on comprendrait que des souris qui ont résisté à l'inoculation d'une tumeur de virulence moyenne puissent prendre une tumeur beaucoup plus virulente. Mais l'expérience 3 vient en opposition avec ce raisonnement : des souris, qui ont résisté à l'inoculation d'une tumeur ayant donné 55 0/0 de succès, prennent une tumeur qui ne fournit que 8 0/0 de cas positifs sur les souris neuves !

Les résultats différents sont probablement dus à un mode d'inoculation différent : Ehrlich inocule, à la pipette, un broyage grossier et épais de tissu cancéreux ; la quantité de tissu injecté représente un nombre considérable de petits fragments analogues à ceux que nous introduisons sous la peau des souris : il y a ainsi résorption d'une assez forte proportion de tissu et on comprend qu'il y ait, dans ces conditions, formation d'un anticorps en quantité suffisante pour empêcher le succès d'une seconde inoculation. L'inoculation d'un petit fragment, au trocart, n'est nullement comparable.

Nous verrons, par la suite, que cette explication est appuyée par des expériences précises.

D'autre part, Ehrlich prétend que l'inoculation négative d'une tumeur, même avirulente, peut conférer aux souris l'immunité contre l'inoculation d'une tumeur virulente de type différent : l'inoculation négative d'un carcinôme hémorragique — doué d'une virulence insignifiante — produirait l'immunité, non seulement contre un carcinôme très virulent, mais aussi contre le sarcôme ; réciproquement, le sarcôme vaccinerait contre le carcinôme (immunité croisée) et ces deux types de tumeurs vaccineraient contre le chondrôme.

Les expériences ci-dessous montrent que la quantité de tissu injecté doit jouer le principal rôle dans de tels résultats, l'inoculation d'un petit fragment au trocart ne produisant qu'une immunité très faible :

Exp. 1 : 43 souris inoculées sans succès, le 31 décembre 1905, avec une tumeur M (adéno-carcinôme qui n'a pu donner aucun passage) sont inoculées le 15 mars 1906 avec la tumeur B :

Résultat : sur 43 souris inoculées 40 tumeurs. 71 0/0.  
— 62 — témoins 51 — 82 0/0.

Exp. 2 : 43 souris inoculées sans succès, le 31 décembre 1905, avec la tumeur M, sont inoculées, le 15 mars suivant, avec la tum. Jensen.

Résultat : Sur 43 souris réinoculées, 3 tumeurs. 23 0/0.  
— 62 — témoins 49 — 32 0/0.

Exp. 3 : 4 souris, inoculées sans succès, le 28 mars 1906, avec la tum. Jensen, sont inoculées, le 16 mai, avec la tum. B.

Résultat : 4 souris réinoculées 4 tumeur 25 0/0.  
2 — témoins 19 — 95 0/0.

b) *Souris ayant résisté à plusieurs inoculations successives.* Les souris qui ont reçu, à deux reprises, un fragment de cancer sous la peau sans présenter de tumeur à la suite de ces inoculations, peuvent être impunément inoculées une troisième fois. C'est du moins la conclusion que nous pouvons tirer de nos expériences. (Michaelis<sup>1</sup> a observé des cas d'inoculations positives sur des souris ayant subi déjà trois inoculations infructueuses, mais il n'indique pas le mode d'inoculation employé.)

Les inoculations successives, pratiquées sur une souris, renforcent l'immunité naturelle que cette souris a manifestée en résistant à une première inoculation ; l'immunité devient alors assez forte pour permettre à l'animal de supporter impunément l'inoculation d'une tumeur très virulente, donnant jusqu'à 100 0/0 de succès chez les témoins.

1. MICHAELIS, *Soc. méd. int.* Berlin, avril 1907.

c) Souris ayant reçu, une ou plusieurs fois, des injections sous-cutanées de tissu cancéreux broyé. — Le tissu étant broyé, le plus finement possible, dans une petite quantité d'eau physiologique, on injecte, à la seringue ou à la pipette, sous la peau des souris, une quantité de broyage représentant, en tissu frais, au moins 5 à 6 fois le volume du fragment qui sert aux inoculations ordinaires. Il peut arriver que des tumeurs se développent à la suite de la 1<sup>re</sup> injection ; c'est exceptionnel quand le broyage est bien fait.

Les souris ainsi traitées sont fortement vaccinées, et il est remarquable qu'une seule injection suffise à les immuniser :

Un 1 <sup>er</sup> lot de 6 souris	est traité	1	fois.
Un 2 <sup>e</sup> —	—	—	2 —
— 3 <sup>e</sup> —	—	—	3 —

Toutes les souris traitées sont inoculées *sans succès* le 27 novembre 1906, alors que 20 souris témoins donnent 11 tumeurs, soit 55 0/0.

Ces résultats viennent à l'appui de ce que nous disions plus haut sur le rôle de la quantité de tissu injecté dans la production de l'immunité, rôle dont l'importance a déjà été signalée par Bashford ; ils expliquent parfaitement l'immunité presque absolue constatée par Ehrlich sur les souris qui ont résisté à une 1<sup>re</sup> inoculation *pratiquée à la pipette*.

d) Souris ayant subi une ou plusieurs injections sous-cutanées de macération de tumeur fraîche. — La macération est obtenue de la façon suivante : la tumeur est broyée finement, comme dans les expériences précédentes, mais avec une quantité d'eau physiologique un peu plus grande : 5 grammes de tissu cancéreux dans 25 à 30 c. c. d'eau physiologique. On laisse déposer quelques minutes. Le liquide trouble qui surnage est injecté à la dose de 2 c. c. sous la peau des souris. De pareilles injections ne donnent jamais de tumeurs.

Exp. 1 : Un lot de 12 souris reçoit de la macération les 10 février, 1<sup>er</sup> mars et 20 avril 1906 ; 11 souris restantes sont inoculées le 16 mai, en même temps que 20 souris neuves, témoins :

Résultat : 11 traitées, 1 tumeur soit : 9 0/0.

20 témoins, 19 — — 95 0/0.

Exp. 2 : 7 souris sont traitées une seule fois, le 14 juin, par une injection de macération, et inoculées le 20 juin, en même temps que 4 témoins :

Résultat : 7 traitées, 0 tumeur. 0 0/0.

4 témoins, 2 — 50 0/0.

Les injections de macération procurent donc aux souris une grande résistance à l'inoculation d'épreuve ; l'immunité n'est pas absolue, et, comme le montre l'expérience 1, l'inoculation d'une tumeur très virulente peut vaincre cette résistance sur une petite proportion de souris.

c) *Souris traitées par la macération filtrée et centrifugée.* — Si on soumet à la filtration sur papier et à la centrifugation la macération préparée comme ci-dessus, et qu'on injecte à des souris le liquide clair obtenu, on ne donnera jamais de tumeurs, et les souris n'acquerront pas d'immunité marquée contre l'inoculation d'épreuve. Traitées, 40 0/0 de tumeurs ; témoins, 50 0/0.

Ceci montre que les éléments cellulaires sont indispensables pour produire l'immunité.

#### 2<sup>o</sup> VACCINATION PAR TISSU CANCÉREUX DESSÉCHÉ.

*Souris traitées par du broyage de tissu cancéreux desséché.* — La dessiccation est opérée dans le vide, en présence de l'acide sulfurique, et le tissu sec conservé en tubes scellés, à la glacière. Si, au bout d'un temps plus ou moins long, un mois ou deux, par exemple, on broie finement le tissu dans de l'eau physiologique et si on l'injecte sous la peau des souris, celles-ci ne prennent pas de tumeurs, mais ne présentent à l'inoculation d'épreuve qu'une immunité relative.

Voici le résultat d'ensemble des expériences faites avec le tissu desséché :

20 souris traitées inoculées :	5 tumeurs, soit	25 0/0.
24 — témoins —	43 — —	54 0/0.

#### 3<sup>o</sup> VACCINATION PAR TISSU CANCÉREUX CHAUFFÉ.

a) *Souris ayant reçu des fragments de tumeur chauffés.* — De petits fragments, semblables à ceux qui servent aux inoculations ordinaires, sont plongés dans de l'eau physiologique et chauffés — au bain-marie et en tubes clos — à diverses températures, à partir de 50°. L'inoculation de ces fragments n'est jamais suivie de succès et elle ne procure aux souris qu'une résistance peu appréciable :

Ainsi, 10 souris reçoivent, le 2 mai 1906, des fragments chauffés ; elles sont inoculées le 28, en même temps que 8 témoins.

Résultat : 10 traitées, 4 tumeurs. 40 0/0.

8 témoins, 5 — 62 0/0.

La quantité de tissu injecté joue encore ici un rôle important : les expériences ci-dessous vont en fournir la preuve.

b) *Souris traitées par du broyage chauffé.* — Le broyage fin, peu dilué, est chauffé pendant 25° à 35°. On injecte, à la seringue ou à la pipette, une quantité de broyage chauffé équivalente à celle qui a été employée dans les expériences de vaccination à l'aide de broyage frais. Aucune tumeur n'apparaît à la suite de ces injections et l'immunité obtenue se montre absolue :

5 souris sont traitées, 1 fois : le 24 octobre 1906.

4 — — — — 2 — 26 — 3 novembre.

5 — — — — 3 — 26 — 3 nov., 12 novembre.

Toutes ces souris sont inoculées sans succès le 27 novembre. Sur 20 souris témoins, 11 tumeurs ; soit 55 0/0.

c) *Souris traitées par la macération chauffée.* — La macération, préparée comme il a été indiqué plus haut, est chauffée à des températures variant entre 40° et 60° et pendant des temps variables :

14 souris traitées par une seule injection donnent, à l'inoculation d'épreuve, 2 tumeurs, soit 14 0/0. Témoins 50 0/0.

Si nous comparons les différents résultats obtenus : d'une part, avec les injections de tissu cancéreux frais ; d'autre part, avec les injections de tissu cancéreux chauffé, nous constatons :

1<sup>o</sup> Que la vaccination la plus parfaite résulte de l'emploi du tissu frais ;

2<sup>o</sup> Que les deux séries d'expériences sont superposables en ce sens que l'immunité acquise est d'autant plus forte que la quantité de tissu injecté est plus considérable. La meilleure vaccination, dans chaque série, est obtenue avec le broyage ; elle est moins assurée par l'emploi de la macération et elle est très imparfaite par l'inoculation négative d'un fragment.

#### 4<sup>o</sup> VACCINATION PAR INJECTIONS DE TISSUS NORMAUX DE SOURIS

Nous nous sommes servi, pour ces injections, de sang frais et d'organes broyés : foie, rate, testicule.

a) *Sang frais.* — Le sang, prélevé sur une souris neuve, est injecté immédiatement sous la peau d'une autre souris ;

la quantité de sang ne dépasse guère 1/4 c. c. Les souris traitées à deux reprises n'ont présenté qu'une faible immunité à l'inoculation d'épreuve :

40 0/0 de tumeurs, au lieu de 55 0/0 chez les témoins.

(Bashford avait obtenu une résistance plus marquée contre la tumeur Jensen : 20 0/0 de tumeurs chez les traitées, 68 0/0 chez les témoins).

b) *Foies broyés*. — Les foies sont broyés aseptiquement et légèrement dilués dans l'eau physiologique; les injections sont pratiquées immédiatement après le broyage et répétées 3 fois, à 12 jours d'intervalle.

Sur 8 souris traitées :	1 tumeur, soit	12 0/0
— 20 — témoins :	11 — —	55 0/0

Il y a donc une immunité certaine. Schöne, Bashford ont obtenu des résultats analogues.

c) *Rates broyées*. — Même façon d'opérer qu'avec les foies :

Sur 8 souris traitées :	0 tumeur, soit	0 0/0
— 20 — témoins :	11 — —	55 0/0

L'immunité est absolue.

d) *Testicules broyés*. — Les injections de broyage testiculaire n'ont donné aux souris aucune résistance vis-à-vis de l'inoculation de la tumeur B :

Sur 6 souris traitées :	3 tumeurs, soit	50 0/0
— 20 — témoins :	11 — —	55 0/0

Il est indiscutable que les injections de certains tissus normaux de souris ne soient capables de conférer aux souris une immunité plus ou moins grande, vis-à-vis de l'inoculation cancéreuse. Cette constatation nous amène à conclure que l'immunité manifestée par les souris traitées n'est pas spécifique, qu'elle n'est pas une immunité anticancéreuse véritable, mais plutôt, comme le disent *B.*, *M.* et *Cr.*, « une iso-immunité vis-à-vis de tissu de l'espèce souris ».

#### INOCULATIONS SIMULTANÉES, CHEZ LA MÊME SOURIS, DE DEUX TUMEURS DE TYPES DIFFÉRENTS

Les tumeurs inoculées sont : la tumeur Jensen et la tumeur B. Des souris inoculées simultanément avec ces deux tumeurs, en des points différents, prennent ces tumeurs avec les mêmes

proportions de succès que si on avait inoculé ces tumeurs individuellement.

Ainsi, sur 50 souris inoculées : à gauche, avec la tumeur Jensen ; à droite, avec la tumeur B, 40 présentent des tumeurs B, et 15 des tumeurs Jensen : ces dernières souris portent deux tumeurs. Aucune des souris indemnes de tumeur B n'a pris la tumeur Jensen : tandis que 25 souris ont pris la tumeur B sans prendre la tumeur Jensen.

Cette constatation est intéressante ; les souris utilisées dans ces expériences étaient de race parisienne et donnaient à l'inoculation de la tum. Jensen seule une proportion de 20 0/0 de succès, proportion obtenue ici, malgré l'inoculation simultanée et positive de la tum. B. La sensibilité individuelle de chaque souris s'est donc manifestée vis-à-vis des deux tumeurs, comme si chacune d'elles lui avait été uniquement inoculée.

D'autre part, chaque tumeur se développe comme si elle était seule ; elle n'est nullement influencée par la croissance de la tumeur voisine.

#### RÉINOCULATIONS CHEZ DES SOURIS PORTANT DES TUMEURS EXPÉRIMENTALES

D'après les expériences rapportées par Ehrlich<sup>1</sup>, les souris portant une tumeur ne pourraient être réinoculées avec succès : les réinoculations positives seraient tout à fait exceptionnelles et cette sorte de résistance vis-à-vis d'une deuxième inoculation serait due à l'absence de la substance X indispensable au développement de la tumeur ; toute la substance X aurait été utilisée par la première tumeur. L'absence de cette substance constitue « l'immunité athrepsique ». Cette immunité serait d'autant plus forte que la première tumeur serait plus virulente.

Bashford, au contraire<sup>2</sup>, réinocule avec succès à une souris, sa propre tumeur, alors que les inoculations à des souris neuves ne donnent que des insuccès ou une proportion infime de résultats positifs. Un tel résultat n'est pas absolument opposé à l'hypothèse d'Ehrlich, puisque la tumeur se montre *avirulente* pour les souris neuves et que l'immunité, d'après Ehrlich, est proportionnelle à la virulence de la tumeur existante ; ces cas de réinoculations positives pourraient constituer les exceptions admises par Ehrlich.

1. EHRlich, Experimentelle karcinomstudien an Maüsen, *Arb. a. d. k. Inst. f. exp. Therapie zu Frankfurt a. M.*, f. 1, 1906.

2. E. F. BASHFORD, IV th. annual report of the Imperial cancer, Research Fund. 1906.

Nos résultats sont bien différents : des souris portant déjà une tumeur expérimentale peuvent prendre une seconde tumeur de même type ou de type différent.

Ainsi, des souris portant des tumeurs Jensen ont pu être inoculées avec succès avec la tumeur B.

D'autre part, des souris portant des tumeurs B ont pu reprendre cette même tumeur et la proportion de cas positifs a été, dans certaines expériences, de 100 0/0, alors que des souris neuves ne fournissaient que 80 0/0 de tumeurs.

Exp. 1 : 10 souris portant des tumeurs B à marche très lente, datant de plus de 3 mois, sont inoculées avec un fragment de tumeur B, du côté opposé à la première tumeur :

Résultat : 10 nouvelles tumeurs sur 10 souris.

8 — — — 40 témoins.

Exp. 2 : 4 souris, portant des tumeurs de 36 jours, sont inoculées en même temps que les deux lots ci-dessus : les 4 souris prennent de nouvelles tumeurs.

Ces résultats tiennent-ils à la faible virulence de la première tumeur ? Non, car dans l'expérience 2, par exemple, les 4 souris portaient des tumeurs d'une inoculation pratiquée le 4 janvier 1906, qui avait fourni 70 0/0 de cas positifs.

La proportion de succès dans ces réinoculations n'est pas toujours aussi élevée, mais de l'ensemble de nos expériences, on peut conclure que *les souris portant déjà une tumeur sont au moins aussi sensibles que les souris neuves à une inoculation nouvelle*.

Voici, d'ailleurs, le résultat d'ensemble des expériences de réinoculation de tumeur du même type B :

42 souris réinoculées donnent 24 nouvelles tumeurs, soit 57 0/0  
88 — inoculées comme témoins 41 tumeurs, — 47 0/0

Il faut signaler à part une expérience où la tumeur réinoculée s'est montrée particulièrement peu virulente chez les souris neuves :

4 souris portant des tumeurs de 65 jours, et 6 souris portant des tumeurs de 30 jours, sont réinoculées le 27 décembre 1906, en même temps que 13 témoins.

Résultat : sur les 4 souris du 1<sup>er</sup> lot, 2 nouvelles tumeurs 50 0/0  
— 6 — 2<sup>e</sup> — 3 — 50 0/0  
— 13 — témoins 1 tumeur 8 0/0

Toutes les expériences de cette série sont en contradiction avec conception d'Ehrlich, et de telles divergences entre ses

résultats et les nôtres ne semblent pouvoir être expliquées que par le mode différent de l'inoculation. Ce que nous avons déjà dit sur le rôle de la quantité de tissu injecté s'applique ici :

Nous employons un simple fragment qui, introduit sous la peau d'une souris, s'organise, sans qu'il y ait résorption d'une quantité appréciable de tissu : par conséquent, pas d'anticorps ; Ehrlich injecte du tissu broyé, représentant plusieurs fois le fragment inoculé au trocart ; supposons le broyage constitué par un nombre plus ou moins grand de petits morceaux de tissu de groupes cellulaires, nous pouvons admettre que la tumeur qui se développera n'aura pour point de départ qu'un seul ou qu'un petit nombre de ces groupes ; tous les autres seront résorbés et pourront donner naissance, au bout de quelques jours, à un anticorps cytolytique ; cet anticorps sera impuissant vis-à-vis de la tumeur déjà formée, mais s'opposera au développement d'une nouvelle tumeur, en cas de réinoculation.

Nous pouvons ainsi résumer les conséquences de l'inoculation par l'une et l'autre méthodes :

Inoculation d'un fragment.	1 <sup>o</sup> L'inoculation est négative : petite quantité de tissu résorbé ; faible formation d'anticorps.	2 <sup>o</sup> L'inoculation est positive ; pas de tissu résorbé ; pas de formation d'anticorps.	Immunité
			peu appréciable. Pas d'immunité.
Inoculation de broyage :	L'inoculation est négative ou positive.	Tissu résorbé : anticorps :	immunité.

L'âge de la 1<sup>re</sup> tumeur a-t-il une influence sur le succès de la réinoculation comme Sticker<sup>1</sup> l'a constaté avec le sarcôme du chien ? Nous ne le pensons pas, en ce qui concerne le cancer des souris ; des souris portant des tumeurs de différents âges ont marqué vis-à-vis d'une même réinoculation une sensibilité égale.

#### DURÉE DE L'IMMUNITÉ

Pour juger de la durée de l'immunité conférée par les différents moyens de vaccination décrits ci-dessus, ou simplement par des inoculations négatives antérieures, nous avons inoculé à nouveau, le 16 avril 1907 :

1<sup>o</sup> Des souris vaccinées par les différentes méthodes (tissu

1. STICKER, *Soc. med. int.*, Berlin, avril 1907.

cancéreux frais, desséché ou chauffé, tissus normaux) en octobre et novembre 1906;

2<sup>o</sup> Des souris inoculées sans succès, à différentes époques;

3<sup>o</sup> Des souris neuves, comme témoins.

Résultat :

1<sup>er</sup> lot : 3 souris vaccinées par le tissu cancéreux sec ; 0 tumeur.  
 3 — — — broyage de tumeur fraîche : 1 —  
 5 — — — — de tumeur chauffé : 0 —

Soit 1 tumeur sur 11 souris vaccinées *depuis plus de cinq mois*, au moyen d'injections de tissu cancéreux : 9 0/0.

8 souris vaccinées par des tissus normaux (rate et foie) donnent 3 tumeurs : 37,5 0/0. Ces tumeurs évoluent très lentement et n'atteignent, au bout de trois mois, que le volume d'une noisette.

2<sup>e</sup> lot : 45 souris n'ayant pas pris de tumeurs à des inoculations pratiquées en octobre, novembre ou décembre 1905, donnent 43 tumeurs : 29 0/0. (La proportion est sensiblement la même chez les souris inoculées en décembre que chez celles qui ont été inoculées en octobre ou novembre.)

3<sup>e</sup> lot : 8 souris neuves donnent 7 tumeurs, soit 87,5 0/0.

On peut conclure de cette expérience que l'immunité acquise peut durer cinq mois et plus.

#### ESSAIS DE SÉROTHÉRAPIE

Les essais ont été faits : 1<sup>o</sup> avec le sérum d'un mouton ayant subi des injections de tissu cancéreux frais; 2<sup>o</sup> avec du sérum de poule préparé de la même façon ; 3<sup>o</sup> avec les sérum normaux de ces deux espèces.

SÉROTHÉRAPIE PRÉVENTIVE. — *Sérum de mouton.* — Le mouton a reçu, au moment des premières expériences (mai 1906), 60 grammes environ de tissu cancéreux frais, en 7 injections sous-cutanées espacées de 3 à 4 semaines ; la saignée a été pratiquée 15 jours après la dernière injection.

Deux lots de souris furent traités ; l'un par 2 c. c. de sérum préparé, l'autre par 2 c. c. de sérum normal, en injections sous la peau du dos. Toutes les souris traitées et un lot de souris neuves furent inoculées le lendemain, avec la tumeur B. P. Résultats : Souris traitées par sérum spécifique : 8 tumeurs sur 8 souris — 100 0/0.

Souris traitées par sérum normal : 8 tumeurs sur 9 souris — 89 0/0.

Souris neuves témoins : 16 tumeurs sur 20 souris — 80 0/0.

Une deuxième expérience, faite en décembre 1906, ne donne pas de meilleurs résultats, quoique le mouton ait reçu, à cette époque, plus de 100 grammes de tissu cancéreux en 13 injections ;

Souris traitées par sérum spécifique : 83 0/0 de tumeur.	
— — — — — sérum normal : 60 0/0	—
— témoins	46 0/0

*Sérum de poule.* — La poule qui a fourni le sérum spécifique a reçu 14 grammes de tissu cancéreux en 3 injections ; elle a été saignée 15 jours après la dernière.

Le 14 mars 1907, 5 souris reçoivent, sous la peau du dos, 1/4 c. c. de sérum spécifique ; 5 souris reçoivent la même dose de sérum normal.

Le 16, les 10 souris sont inoculées avec la tumeur B, en même temps que 10 souris témoins.

Résultat : sur 5 souris traitées par le sérum spécifique ; 4 tumeurs : 80 0/0.

Sur 5 souris traitées par le sérum normal 5 tumeurs : 100 0/0.

Sur 9 souris témoins, 9 tumeurs : 100 0/0.

Ces résultats ne sont pas encourageants ; il est même remarquable que les animaux traités par le sérum spécifique de mouton aient donné une plus forte proportion de tumeurs que les témoins. Nous ne chercherons pas à expliquer ce fait, mais nous pensons qu'il y aurait avantage, dans de telles expériences, à n'employer qu'une quantité faible de sérum et à pratiquer l'injection préventive deux jours au moins avant l'inoculation d'épreuve. Il est possible enfin que l'injection d'une quantité plus grande de tissu cancéreux aux animaux fournisseurs de sérum donne de meilleurs résultats et que le choix de ces animaux joue un certain rôle.

**SÉROTHÉRAPIE CURATIVE.** — Au point de vue curatif, les sérum spécifiques n'ont pas donné de résultats appréciables ; mais il faut reconnaître que l'évolution des tumeurs expérimentales est si rapide, qu'il faudrait un sérum particulièrement actif pour être capable de l'enrayer ou de la retarder. La sérothérapie curative ne peut être étudiée qu'avec des tumeurs à marche suffisamment lente.

*In vitro*, nous n'avons constaté aucune action cytolytique de ces sérum.

En terminant cet exposé, nous devons mentionner des expériences de traitement curatif au moyen d'injections de macération de tumeur fraîche :

Chaque souris recevait, à des intervalles de 10 à 15 jours, 1/2 c. c. de macération épaisse.

Un certain nombre de souris sont mortes dans les jours qui suivirent la première injection; d'autres ont supporté jusqu'à quatre injections.

Les résultats obtenus n'ont pas été concluants; cependant, une souris traitée par trois injections a résorbé sa tumeur qui était, au début du traitement, de la grosseur d'un pois. Ce fait peut être signalé, les cas de résorption d'une tumeur du type B étant excessivement rares.

#### CONCLUSIONS

1<sup>o</sup> L'immunité contre le cancer expérimental des souris n'est pas une immunité anticancéreuse proprement dite; elle n'est pas spécifique: elle peut être conférée par des injections de tissu cancéreux ou par injections de certains tissus normaux de souris;

2<sup>o</sup> A proportions égales, les injections de tissu cancéreux donnent une immunité plus active que les injections de tissus normaux (rate exceptée);

3<sup>o</sup> L'immunité obtenue est proportionnelle à la quantité de tissu injecté.

# TOXICITÉ DES SÉRUMS THÉRAPEUTIQUES

SA VARIABILITÉ ET SON DOSAGE<sup>1</sup>

PAR LE Dr BESREDKA

Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.

Un sérum peut posséder de grandes qualités thérapeutiques, être préparé dans les meilleures conditions possibles; cela n'empêche que, dans certains cas, son emploi puisse donner naissance à des troubles sérieux et même inquiétants. Ces troubles, qui n'ont rien à voir avec la présence de l'anticorps spécifique et qui relèvent uniquement des matières contenues dans tout sérum de cheval, offrent chez l'homme un ensemble très caractéristique. Chez les animaux, on ne sait pas encore reproduire les mêmes symptômes, surtout au moyen d'une seule injection; en revanche, on peut préparer les animaux, notamment des cobayes, de façon à déterminer chez eux des troubles beaucoup plus graves et la mort en quelques minutes.

Malgré cette différence, tout porte à croire que dans les deux cas, chez l'homme et le cobaye, les accidents sérieux sont régis par le même mécanisme. Il importe donc d'en tenir compte et d'instituer pour tout sérum employé à titre thérapeutique, à côté du dosage du pouvoir antitoxique, aussi celui de son pouvoir toxique.

Comment faire ce dosage?

Dans un travail<sup>2</sup> fait en collaboration avec E. Steinhardt, nous avons constaté le fait suivant: les cobayes qui avaient servi au dosage du sérum antidiptérique ou qui avaient reçu sous la peau une fraction (1/100-1/200 c. c.) de sérum de cheval quelconque, réagissent d'une manière extrêmement vive à toute nouvelle injection de sérum, lorsque celui-ci est porté, 12 jours plus tard, directement dans le cerveau. Ce sont précisément ces cobayes « sensibilisés » qui constituent un réactif de la plus haute sensibilité lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité d'un sérum.

L'expérience nous a montré, en effet, que ces cobayes, quoique sensibilisés dans des conditions égales, se montrent inéga-

1. Voir la note préliminaire dans les *Compt. rend. Soc. Biol.*, 46 mars 1907

2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 25 févr. 1907, p. 117-127.

lement susceptibles vis-à-vis de sérums de différentes origines et que, pour le même sérum, l'intensité de la réaction est en raison directe de la dose injectée dans le cerveau.

Pour nous faire une idée des différences de toxicité que peuvent présenter des sérums, nous en avons fait venir un grand nombre, tant normaux que thérapeutiques, de Russie (Saint-Pétersbourg, Odessa, Kharkoff, Kieff), d'Allemagne, d'Angleterre, de Belgique, de Suisse, d'Autriche, d'Amérique du Nord et du Sud, de Roumanie et de Turquie.

Les doses de sérum injecté variaient de 1/4 à 1/160 c. c. ; quel que fût la quantité de sérum, nous faisions la dilution de telle sorte que la totalité de liquide injecté dans le cerveau fût toujours égale à 1/4 c. c. Le nombre d'échantillons examinés a été de près de 60. Nous ferons grâce aux lecteurs des chiffres, sauf de quelques-uns qui seront rapportés plus bas ; nous essayerons surtout d'en dégager des conclusions générales.

\* \* \*

Tant que nous nous bornions à injecter sous la dure-mère de chaque sérum 1/4 c. c., il nous fut impossible de noter aucune différence d'un sérum à l'autre. Sauf de très rares exceptions, à cette dose de 1/4 c. c., tous les échantillons, quels qu'en fussent le pays d'origine, la nature et l'âge, tuaient le cobaye en 2-3 minutes, et s'ils ne tuaient pas, ils ne manquaient jamais de provoquer des troubles anaphylactiques des plus graves.

Ce n'est que lorsque nous avons diminué progressivement les doses, que nous avons pu faire ressortir les différences individuelles entre divers échantillons de sérum ; nous avons pu nous assurer alors que rien n'était plus facile que de constituer pour chaque sérum, d'une façon très précise, sa fiche de toxicité.

En compulsant ces fiches, dont nous avons dressé plusieurs pour chaque sérum, nous sommes arrivés à conclure que si d'un sérum à l'autre il y a parfois des différences de toxicité considérables, cela tient au moins à deux facteurs : d'une part, il y a lieu de tenir compte de l'âge du sérum et, d'autre part, des propriétés individuelles qui relèvent probablement de la race des chevaux, de leur nourriture et de la manière de récolter le sérum.

Nous avons vu que l'addition de liquides conservateurs, tels

que acide phénique, tricrésyl, chloroforme, n'exerce aucune influence sur la toxicité du sérum.

Il n'en est pas de même du chauffage que, dans certains Instituts, on fait subir aux sérum ; nous en reparlerons longuement ailleurs ; ici disons seulement que les sérum chauffés sont sensiblement moins toxiques que les non chauffés. Mais ce qui nous intéresse en ce moment, c'est la toxicité propre des sérum avant qu'ils n'aient subi aucune modification.

\* \*

Des deux facteurs de toxicité que nous venons de signaler, celui qui relève de l'âge du sérum n'est important que tant que le sérum est relativement jeune. Après un mois et demi ou deux mois, au maximum, ce facteur devient négligeable et c'est la toxicité individuelle seule qui entre en jeu.

Or, si l'on éprouve des sérum à ce moment-là, c'est-à-dire après deux mois de séjour *in vitro*, on constate que, à la dose de 1/20 c. c. et même de 1/16 c. c., la plupart d'entre eux sont bien supportés par des cobayes sensibilisés.

Nous avons eu cependant entre les mains un assez grand nombre de sérum qui tuaient à la dose de 1/16 c. c., puis d'autres encore — peu nombreux, il est vrai — qui se montraient meurtriers à des doses de 1/32 et 1/64 c. c. : ces derniers donnaient encore lieu à des troubles anaphylactiques dans des dilutions plus grandes (jusqu'à 1/160 c. c.).

Les causes de cette toxicité nous échappent ; ce qu'il faut savoir c'est qu'elle existe ; il est utile d'en être prévenu pour chercher à y porter remède.

\* \*

L'autre facteur de toxicité, celui qui est fonction de l'âge du sérum peut, par contre, être analysé de très près. Nous l'avons étudié sur les chevaux de l'Institut Pasteur chez lesquels nous avons pu éliminer, autant que possible, toutes les influences étrangères. Ainsi, les chevaux choisis pour ces expériences étaient tous dans les mêmes conditions : tous de même origine, soumis au même régime alimentaire, puis vaccinés et saignés toujours de la même façon et en même temps.

Malgré cette égalité des conditions, on a pu surprendre de temps à autre des différences de toxicité d'un cheval à l'autre ;

ces écarts individuels s'observaient cependant rarement; de plus, ils se traduisaient par des chiffres qui variaient, tout au plus, du simple au double, lors de fortes dilutions des sérum.

Quelques chiffres tirés des cahiers d'expériences pourront nous indiquer la toxicité des sérum jeunes, ainsi que les caractères de décroissance de la toxicité, suivant le temps qui s'est écoulé depuis la saignée.

Après 40 heures (depuis la saignée) :

Exp. 1. — 1/64 c. c. : troubles légers.

1/32 c. c. : symptômes d'anaphylaxie; mort.

Exp. 2. — 1/64 c. c. : malaise.

1/32 c. c. : mort.

Exp. 3. — 1/64 c. c. : malaise.

1/32 c. c. : symptômes d'anaphylaxie; se rétablit à la longue.

Après 44 jours :

Exp. 1. — 1/32 c. c. : symptômes d'anaphylaxie graves.

1/16 c. c. : mort.

Exp. 2. — 1/32 c. c. : symptômes graves.

1/16 c. c. : mort.

Exp. 3. — 1/32 c. c. : symptômes d'anaphylaxie.

1/16 c. c. : Idem.

Exp. 4. — 1/32 c. c. : mort.

1/16 c. c. : Id.

Après 45 jours :

Exp. 1. — 1/16 c. c. : symptômes d'anaphylaxie graves.

Exp. 2. — 1/16 c. c. : symptômes d'anaphylaxie très graves; agonie durant 2 heures; mort.

Après 415 jours

Exp. 1. — 1/16 c. c. : symptômes d'anaphylaxie.

1/8 c. c. : mort.

Exp. 2. — 1/16 c. c. : pas de symptômes appréciables.

1/8 c. c. : mort.

Exp. 3. — 1/12 c. c. : symptômes d'anaphylaxie graves; longue agonie; finit par se rétablir.

Après 43 mois 1/2 :

Exp. 1. — 1/16 c. c. : symptômes d'anaphylaxie.

1/8 c. c. : symptômes très graves; finit par se remettre.

Exp. 2. — 1/16 c. c. : symptômes d'anaphylaxie.

1/8 c. c. : Idem.

1/4 c. c. symptômes très violents; agonie pendant 1 h. 1/2; se rétablit.

Après 13 ans :

Exp. 1. — 1/8 c. c. : symptômes d'anaphylaxie.

1/4 c. c. : mort,

\*\*\*

Ces chiffres montrent que, malgré quelques écarts individuels, faibles d'ailleurs, la toxicité des sérum, à peu près égale au départ, décroît d'une façon assez régulière. Très toxique le jour de la saignée (dose mortelle = 1/32 c. c.), le sérum perd rapidement de toxicité dans les dix premiers jours qui la suivent; ainsi, vers le onzième jour, elle est déjà diminuée de deux fois (dose mortelle = 1/16 c. c.). Puis, elle continue à décroître pendant un mois ou un mois et demi, mais cette fois-ci lentement, de sorte que, 45 jours après la saignée, le sérum détermine encore à la même dose (1/16 c. c.) des troubles anaphylactiques très graves, sans amener cependant nécessairement la mort.

Passé le délai de deux mois, la toxicité du sérum se maintient pendant des mois au même niveau (dose mortelle = 1/8 c. c.); elle s'atténue probablement encore avec le temps, mais d'une façon à peine appréciable : tous nos sérum âgés de plus de deux mois présentaient la même toxicité (1/8 c. c.); ce qui est certain, c'est que la toxicité ne disparaît jamais complètement, car dans un échantillon de sérum antidiptérique qui a été conservé par M. Roux pendant 13 ans, nous avons trouvé la dose mortelle égale à 1/4 c. c.

Ajoutons que la substance qui fait déclencher les troubles anaphylactiques chez un cobaye sensibilisé, se trouve uniquement dans le sérum : le sang de cheval, défibriné et lavé, puis dissous dans l'eau distillée, ne détermine aucun trouble.

\*\*\*

Sans que l'on soit encore autorisé à considérer comme équivalentes la toxicité d'un sérum pour un cobaye sensibilisé et celle pour l'homme, il n'en est pas moins vrai que l'usage des sérum toxiques est à éviter dans la thérapeutique humaine.

Les expériences qui précèdent montrent qu'en n'employant que des sérum âgés d'au moins deux mois, on sera sûr d'avoir

éliminé un des principaux facteurs de la toxicité. Les autres facteurs nous sont encore inconnus, mais ce que nous pouvons, c'est dire chaque fois si un sérum est toxique ou non, et quel est le degré de cette toxicité.

D'après les règlements élaborés à l'Institut sérothérapeutique de Francfort, tout sérum thérapeutique doit satisfaire aux quatre conditions suivantes<sup>1</sup> : 1<sup>o</sup> il doit être limpide et ne pas contenir de gros dépôt; 2<sup>o</sup> il ne doit pas contenir de microbes; 3<sup>o</sup> il ne doit pas contenir plus de 0,5 0/0 de phénol; 4<sup>o</sup> il ne doit pas contenir de toxine libre, notamment de toxine tétanique.

Attendu qu'il est facile maintenant de doser la toxicité des sérum, nous croyons qu'il serait utile d'ajouter aux quatre conditions précédentes une cinquième, ainsi conçue : 5<sup>o</sup> un sérum thérapeutique ne doit pas dépasser la toxicité moyenne propre à la majorité des sérum; nous sommes d'avis qu'un sérum capable de tuer un cobaye sensibilisé ou de provoquer chez lui des troubles très graves à la dose de 1/20 ou même 1/16 c. c. et, à plus forte raison, au-dessous de 1/20 c. c., est à considérer comme ayant une toxicité au-dessus de la moyenne et comme tel ne doit pas être admis à l'usage.

Quant à la technique de ce dosage, elle est d'une très grande simplicité; l'injection intracérébrale demande tout au plus une minute; de plus, ce dosage n'entraîne aucune dépense, les animaux ayant servi au dosage de sérum antidiphétique pouvant très bien convenir à cet effet.

#### CONCLUSIONS

La toxicité des sérum thérapeutiques peut être dosée au moyen d'injections intracérébrales à des cobayes sensibilisés.

Ces dosages montrent qu'il existe toute une gamme de toxicité pour des sérum de provenance différente, la dose mortelle pouvant varier de 1/4 c. c. à 1/128 c. c. Cette toxicité est propre au sérum et non aux éléments figurés du sang.

Les sérum des chevaux, vivant dans des conditions semblables, sont de toxicité sensiblement la même; les écarts individuels sont rares et de peu d'importance.

La toxicité variable des sérum paraît liée, en premier lieu, au lieu d'origine et, en deuxième lieu, à leur âge.

1. OTTO, *Die staatliche Prüfung der Heilsera*, Iena, 1906.

Hypertoxique le jour de la saignée, les sérum perdent peu à peu de leur toxicité; cette baisse, rapide au début, se ralentit à partir du dixième jour.

Tout sérum thérapeutique, pris tel quel, doit être considéré comme toxique pendant deux mois à partir du jour de la saignée.

D'une manière générale, tout sérum qui provoque des phénomènes anaphylactiques graves à la dose de 1/16-1/20 c. c. et *a fortiori* au-dessous de cette dose, doit être considéré comme toxique.

La technique du dosage par la voie intracérébrale est simple, rapide et pas coûteuse.

# Contribution à l'étude de la culture de "Treponema pallidum"

PAR MM. C. LEVADITI ET J. MC INTOSH (DE ABERDEEN).

Avec les Pl. XIX et XX.

(Travail du laboratoire de M. le professeur Metchnikoff.)

Les nombreuses tentatives faites pour cultiver les diverses espèces de spirochètes pathogènes ou saprophytes sont restées, pour la plupart, totalement infructueuses. On considérait la culture de ces micro-organismes comme extrêmement difficile sinon impossible, lorsque, en 1906, l'un de nous eut l'idée d'employer le procédé des sacs en collodion qui avait rendu de si grands services en bactériologie. Grâce à ce procédé, Levaditi<sup>1</sup> réussit à cultiver non seulement le *Spirochaeta gallinarum*, mais aussi le *Sp. Duttoni* et le *Sp. refringens* de Schaudinn et Hoffmann. Il montra que ces parasites peuvent se multiplier pour ainsi dire à l'infini, sans montrer d'autres formes que celles en spirale; de plus, on constata qu'après un très grand nombre de passages la virulence de ces microbes s'atténue sensiblement. Peu après la publication de ces recherches, Mühlens et Hartmann<sup>2</sup> annoncèrent qu'il était possible d'obtenir des cultures pures du *Spirochaeta dentium*, saprophyte fréquent de la cavité buccale, en se servant de la technique recommandée par Ellermann<sup>3</sup> pour la culture *in vitro* du bacille fusiforme de Vincent (mélange de gélose et de sérum de cheval, méthode de Veillon). Enfin, tout récemment, Novy et Knapp<sup>4</sup> confirmèrent les constatations de Levaditi et obtinrent des cultures pures du *Sp. Obermeyeri* en sacs de collodion placés dans la cavité péritonéale du rat.

Ces données montrent que, quoique entourée de certaines difficultés techniques, la culture des spirochètes n'est cependant pas impossible. Il était donc tout indiqué d'appliquer les mêmes procédés à la culture du *Treponema pallidum*, agent pathogène de la syphilis. Au cours des deux dernières années,

1. LEVADITI, *C. R. de l'Acad. des Sciences*, 14 mai 1906.

2. MÜHLENS ET HARTMANN, *Zeitschr. f. Hyg.*, vol. LV, 1906, p. 81.

3. ELLERMANN, *Centralbl. für Bakter. Orig.*, vol. XXXVII.

4. NOVY ET KNAPP, *Journ. of the Amer. Med. Assoc.*, 1906, p. 2452.

l'un de nous a fait de nombreuses tentatives dans cette voie, mais aucune n'a été suivie de résultats encourageants. Ni dans le tube à essai, ni dans les sacs en collodion placés dans le péritoine des lapins, les tréponèmes des lésions de la syphilis acquise ou héréditaire n'ont montré la moindre tendance à se multiplier. La question était au même point où l'avaient laissée les essais infructueux de Bertarelli et Volpino<sup>1</sup> et de Souza<sup>2</sup>, lorsque, en mai 1907, nous eûmes l'idée de placer les sacs en collodion ensemencés avec des tréponèmes vivants, non plus dans la cavité péritonéale du lapin, mais dans le péritoine du singe. Grâce à cette modification de technique, il nous a été possible d'obtenir des cultures abondantes, quoique impures, d'un spirochète ayant la plus grande ressemblance avec le *Treponema pallidum*, et dont il ne diffère que par l'absence de pouvoir pathogène. Voici les détails de nos constatations :

Le 11 mai 1907, on sacrifie un *Macacus Rhesus* n° 37, porteur de syphilitomes primaires aux deux arcades sourcilières. L'animal avait été inoculé le 20 mars avec du suc d'un chancre humain datant de 15 jours, riche en tréponèmes; les premiers signes locaux apparurent après une incubation de 17 jours. Actuellement, il présente de petites papules peu ulcérées, couvertes de croûtes grisâtres et légèrement confluentes. Les tréponèmes, assez rares sur frottis, se montrent de beaucoup plus nombreux sur coupes traitées à l'argent. Ces coupes offrent d'ailleurs les altérations caractéristiques du chancre syphilitique.

Après avoir lavé les lésions sourcilières avec de l'eau salée isotonique stérile, on enlève les croûtes et on racle légèrement la surface de ces lésions. On laisse s'écouler quelques gouttes de suc mélangé à du sang, et on recueille la lymphe qui suinte bientôt après. Cette lymphe ainsi que le suc des ganglions lymphatiques sous-maxillaires sont ensemencés dans deux sacs en collodion contenant du sérum humain préalablement chauffé à 60 degrés. Les tubes de verre sur lesquels les sacs sont ajustés sont fermés à la flamme et placés dans le péritoine d'un *Macacus cynomolgus*<sup>3</sup>; l'animal est en même temps inoculé par scarification aux deux arcades sourcilières, avec du suc du chancre du *Rhesus* 37.

1. BERTARELLI ET VOLPINO, *Centralbl. für Bakter. Orig.*, vol. XL, fasc. 1, 1905, p. 56.

2. SOUZA ET PEREIRA, *Berl. klin. Woch.*, 1900, n° 44.

3. La technique opératoire est des plus simples. Après chloroformisation et asepsie, on pratique une boutonnierre sur la ligne médiane de l'abdomen, au niveau de l'ombilic, et on incise les muscles et le péritoine. On place les saos dans les parties latérales de la cavité et on pratique la suture en deux plans. Nous tenons à remercier chaleureusement M. le Dr Pozerski qui a bien voulu se charger de cette opération.

Le macaque opéré n'a montré aucun trouble général ni local jusqu'au 3 juin 1907. A ce moment, c'est-à-dire 23 jours après l'inoculation du virus, l'animal présenta deux lésions syphilitiques commençantes au niveau des arcades sourcilières, dans le suc desquelles on décela de rares tréponèmes. Partant de l'idée que le développement des spirochètes dans les sacs placés dans le péritoine doit exiger un temps égal à celui de la pullulation de ces parasites au niveau de la peau, on jugea opportun de sacrifier l'animal au moment même où l'accident cutané était devenu nettement apparent. C'est ce qui fut fait le 3 juin.

A l'ouverture du péritoine, on constate que les deux sacs sont emprisonnés dans une poche formée par l'épiploon en partie adhérent à la paroi abdominale. Cette poche contient du pus consistant, ayant une odeur de putréfaction. Un des sacs, mieux conservé que l'autre, renferme environ 1 c. c. d'un liquide trouble, légèrement grisâtre, riche en éléments microbiens. L'examen microscopique de ce liquide révèle la présence d'un très grand nombre de spirochètes qui, observés à l'état vivant ou après coloration au Giemsa ou au violet de gentiane, offrent la plus grande ressemblance avec le *Treponema pallidum*.

Aussi, il nous a été possible de réaliser une première culture du tréponème en puisant le matériel d'ensemencement dans un accident primaire du Rhesus et en plaçant nos sacs en collodion dans le péritoine d'un *Macacus cynomolgus*. Dans la suite, nous eûmes soin de faire des passages successifs de cette première culture, d'étudier les caractères morphologiques et biologiques de notre microbe, ainsi que sa virulence, et de le purifier autant que possible.

Nous avons constaté tout d'abord qu'il est extrêmement facile de réaliser de nombreux passages en plaçant les sacs dans la cavité péritoneale du *lapin*. La seule difficulté provient de ce que ces sacs, sous la pression des gaz qui se développent à la suite de la pullulation des anaérobies, se perforent<sup>1</sup>. Il s'ensuit une péritonite aiguë qui emporte les animaux avant que le tréponème réussisse à se multiplier. On peut d'ailleurs éviter cet écueil en ayant soin de se servir de sacs épais et très résistants. Mais, si rien ne vient compliquer l'expérience, on obtient des cultures extrêmement abondantes en tréponèmes dans des sacs ayant séjourné de 4 à 5 jours dans le péritoine du lapin. A l'ouverture de ces sacs, on se trouve en présence d'un liquide épais, crémeux, ayant la consistance des crachats et dont la couleur est légèrement grisâtre. Ce liquide, dont l'odeur

1. Nous avons constaté que les tréponèmes peuvent pulluler dans la poche purulente qui se forme autour des sacs perforés.

rappelle celle des matières protéiques en putréfaction, est très riche en tréponèmes vivants et mobiles, et de plus contient une flore microbienne assez variée.

En procédant de la façon qui vient d'être indiquée, nous avons pu réaliser jusqu'à présent 12 passages et nous avonsensemencé avec succès 59 sacs dans un intervalle de 74 jours. Malgré la dilution progressive du matériel virulent, les dernières cultures se sont montrées plus riches en tréponèmes que les premières; cela tient au fait que les parasites se sont acclimatés de plus en plus à l'organisme du lapin<sup>1</sup>. Nous continuons actuellement à pratiquer des ensemencements à des intervalles plus espacés qu'au début de nos recherches (de 10 en 10 jours) et tout porte à croire que la culture pourra ainsi être prolongée à l'infini.

Le microbe de Schaudinn est accompagné dans nos sacs par plusieurs espèces de bactéries dont quelques-unes ont pu être isolées. Parmi ces bactéries, une seule espèce se développe en milieu aérobio (gélose inclinée et bouillon). C'est un streptocoque identique au *Str. pyogenes*. Les autres microbes sont strictement anaérobies et ne pullulent que dans la gélose sucrée, en tubes de Veillon; ce sont un coccus très fin, producteur de gaz, et deux espèces de bacilles dont une seule est douée de mobilité. Ces bactéries ne paraissent pas s'opposer au développement du tréponème. Au contraire, leur présence semble favoriser ce développement, les microbes étrangers étant capables de modifier la constitution chimique du milieu, qu'ils rendent plus assimilable. Tous nos essais d'isolation sont en effet restés infructueux<sup>2</sup>. Chaque fois que nous avons dilué préalablement le matériel d'ensemencement, afin de diminuer le nombre des bactéries étrangères et d'isoler le tréponème, nous n'avons obtenu aucun développement de ce dernier. L'introduction d'un grand nombre de microbes anaérobies, en assurant leur multiplication rapide et une modification profonde du milieu, est une des conditions qui favorise le mieux la culture du tréponème en sac de collodium.

Ajoutons que nous nous sommes heurtés à des difficultés insurmontables lorsque nous avons essayé d'obtenir des

1. On peut employer comme milieu de culture le sérum humain ou le sérum de lapin et de cheval, chauffés à 60°.

2. Ayant essayé d'isoler le tréponème par filtration à travers des bougies Berkefeld amincies, nous avons constaté que le microbe ne traverse pas ces filtres.

cultures *in vitro*. Si dans les premiers tubes de sérum ensemencés et conservés à la température de la chambre ou à 38°, on constate une multiplication certaine des tréponèmes, par contre, dans les cultures ultérieures, on n'obtient que la pullulation des parasites étrangers. Les échanges, qui, dans la cavité péritoneale, s'opèrent entre le contenu du sac et le milieu ambiant, paraissent être une *conditio sine qua non* du développement du tréponème.

\*\*

Voici les caractères morphologiques et biologiques des spirochètes cultivés par nous :

*Examen à l'état frais.* — Nos recherches ont été faites avec le microscope ordinaire et à l'aide de l'ultra-microscope de Reichert. Examiné à l'état frais, le spirochète apparaît comme un filament spiralé extrêmement mince et peu réfringent. A l'ultra-microscope, ses ondulations sont très régulières, profondes, et il est impossible de différencier notre microbe d'un tréponème typique puisé directement dans des manifestations syphilitiques.

Les mouvements sont les mêmes que ceux du parasite de Schaudinn et Hoffmann. Notre tréponème montre en effet des mouvements lents de rotation autour de l'axe longitudinal; il se déplace en avant ou en arrière avec une certaine vivacité et offre en plus des mouvements pendulaires ou ondulatoires. Ce sont là les caractères de la mobilité des formes typiques de notre tréponème (formes pourvues de 8 à 12 spires serrées et régulières). Mais en plus, nous avons rencontré des spirochètes d'habitude plus longs, offrant des mouvements d'une vivacité inaccoutumée et dont les tours de spires paraissaient au premier abord plus larges et moins réguliers que ceux des tréponèmes de la syphilis. Un examen approfondi montrait cependant que ces parasites ne différaient en rien des tréponèmes, sitôt qu'ils étaient en état de repos. Nous avons constaté, en effet, que des spirochètes doués de mouvements lents et de spires serrées et égales pouvaient, à un moment donné, montrer une mobilité plus accentuée, à caractères ondulatoires; cette mobilité s'accompagnait alors de la formation d'ondes espacées, simulant des tours de spires larges et irréguliers. Les spirochètes reprenaient d'ailleurs leur aspect habituel dès que cette mobilité vive était remplacée par des mouvements plus lents.

Tout comme le *Treponema pallidum*, notre parasite ne perd

pas sa forme spirallée lorsqu'il cesse de se mouvoir. On sait, depuis les recherches de Schaudinn et Hoffmann et de Prowazek, que c'est là un des caractères principaux de ce tréponème; seul le *Spirochaeta dentium* offre cette particularité, les autres spirochètes ayant une tendance manifeste à devenir rectilignes dès qu'ils sont au repos.

Quant à la durée de la mobilité de notre tréponème *in vitro*, elle varie suivant que le parasite est conservé à la température de la chambre ou à 38° degrés. Gardé à l'étuve anaérobiquement, dans des tubes scellés à la flamme, le parasite cesse de se mouvoir déjà au bout de deux jours. Par contre, à la température du laboratoire et dans les mêmes conditions de conservation, notre microbe montre encore quelques mouvements à peine ébauchés, pendant 6 à 7 jours. Il se rapproche donc, à ce point de vue, du *Treponema pallidum* dont la mobilité est, d'après les nouvelles recherches de Landsteiner et Mucha<sup>1</sup>, d'assez courte durée. Ces auteurs ont montré que contrairement aux affirmations de Hoffmann et de Beer<sup>2</sup>, le microbe de la syphilis, gardé entre lame et lamelle, s'immobilise déjà au bout de deux jours, et que la température du thermostat suspend rapidement sa motilité. Ajoutons que, d'après nos constatations, les conditions de vie anaérobie semblent influencer favorablement la vitalité de notre tréponème, ce qui est conforme aux données publiées par Hoffmann et Beer.

Les réactions colorantes de notre spirochète peuvent se résumer ainsi :

Par le procédé de Giemsa ou par celui de Marino, le tréponème des cultures se colore en violet rougeâtre, tout comme le spirochète de la syphilis. Son affinité pour les matières colorantes est tout aussi peu accentuée que celle de ce spirochète. En effet, il ne fixe l'azur qu'après un contact de plusieurs heures avec la solution faible de Giemsa et ne se colore par le violet de gentiane que si on chauffe légèrement les préparations. Le meilleur procédé rapide pour teindre le parasite est celui de Löffler (col. des cils), recommandé d'ailleurs par Borrel et Burnet<sup>3</sup>.

1. LANDSTEINER ET MUCHA, *Centralbl. für Bakter. Orig.*, vol. XXXIX, 1907, n° 17/19.

2. BEER, *Deutsche med. Woch.*, 1906, n° 36, p. 1192.

3. BORREL ET BURNET, *C. R. de la Société de Biolog.*, 1906, séance du 27 janvier, page 212.

pour la coloration du tréponème des lésions syphilitiques. On obtient de très belles préparations si on a soin de diluer préalablement la culture avec de l'eau distillée, de fixer à l'acool ou à la flamme et de mordancer deux fois. Les tréponèmes apparaissent alors colorés en rouge brillant sur un fond clair (v. Pl. XX, fig. 2 à 11.)

Ajoutons que l'emploi des procédés à l'argent pur ou combiné à la pyridine nous a permis de colorer notre spirochète sur coupes<sup>1</sup>.

Les dimensions du spirille des cultures se rapprochent sensiblement de celles du *Treponema pallidum*. Son épaisseur, difficile à mesurer, varie entre  $1/3$  et  $1/2$   $\mu$ ; sa longueur est de minimum  $3,5$   $\mu$  et de maximum  $15,5$   $\mu$ , en moyenne  $9$   $\mu$ . Quant à sa forme, elle ne saurait être distinguée de celle des tréponèmes typiques. Notre spirochète, extrêmement mince, montre des *ondulations* serrées, régulières et assez profondes. Le nombre des tours de spires est variable. A part les tréponèmes exceptionnellement courts, à 2 ou 3 ondulations, et des parasites démesurément longs ayant plus de 20 spirales, la plupart de nos spirochètes possèdent de 8 à 10 tours de spires. La profondeur des ondulations, quoique légèrement moins accentuée que celle du *pallida*, s'en rapproche beaucoup. La disposition en tire-bouchon est des plus apparentes.

Quant aux caractères des *extrémités*, ils varient suivant le procédé de coloration. Sur les préparations traitées au Giemsa ou au Marino, ces extrémités se terminent en pointe et sont effilées, comme celles du tréponème de Schaudinn (v. Pl. XX, fig. 20 et 21). Par contre, sur les frottis colorés au Löffler, il est fréquent de déceler des parasites terminés d'une façon abrupte. Cette disposition se rencontre d'ailleurs assez souvent chez les tréponèmes typiques colorés par la méthode à l'encre de fuchsine.

Nous avons recherché si notre spirochète possède des *cils* terminaux ou périthriches, et nous nous sommes adressés pour cela au procédé de Löffler et à celui de Van Ermengen. Grâce à l'emploi du premier de ces procédés, nous avons réussi à mettre en évidence l'existence d'un seul prolongement filiforme situé à l'une des extrémités du parasite (v. Pl. XIX, fig. 2; Pl. XX,

1. Pour ce faire, nous avons injecté dans le foie des rats quelques gouttes de la culture et nous avons fixé les pièces sitôt après l'injection.

fig. 44, 46). Ce prolongement ressemble aux formations analogues décrites par Borrel<sup>1</sup> chez le tréponème de Schaudinn. Il s'agit de filaments très fins et pâles, implantés au milieu ou sur les côtés de l'extrémité du parasite, et dessinant 3 ou 4 ondulations dont l'amplitude correspond à celle des ondulations du spirochète. Jamais nous n'avons rencontré des tréponèmes pourvus de deux cils à une seule extrémité, comme cela a été vu et figuré par Schaudinn<sup>2</sup>.

Il est difficile de préciser la nature et la signification de ces prolongements ciliformes. Etant donné que nos cultures en sacs sont impures, rien ne nous assure que tous les parasites spiralés qui s'y rencontrent appartiennent à une seule et même espèce et qu'ils doivent être identifiés sans exception avec le *Treponema pallidum*. Aussi sommes-nous dans l'impossibilité d'affirmer que les spirochètes possédant un seul cil terminal sont réellement des *pallida*.

Le tréponème des cultures se multiplie par *division transversale*. S'il nous a été impossible de découvrir des formes pouvant plaider en faveur d'une segmentation longitudinale, par contre nous avons fréquemment rencontré deux spirochètes attachés par une de leurs extrémités et réunis par une partie plus mince et légèrement effilée (v. Pl. XIX, fig. 4; Pl. XX, fig. 23, 24). Cette disposition ressemble à celle qu'on a souvent constatée chez le *Sp. gallinarum* et le *Sp. Duttoni*.

Avant de clore la description de notre tréponème, nous désirons attirer l'attention sur certaines formes particulières rencontrées dans nos cultures. Il s'agit de *spirochètes enroulés sur eux-mêmes*, disposés en boucles et qui existent fréquemment dans les sacs ayant séjourné longtemps dans le péritoine du lapin. Cette disposition a été constatée chez le tréponème de la syphilis et a été décrite tout dernièrement encore par Prowazek<sup>3</sup>, qui la considère comme un *stade de dépression* dans le cycle évolutif de ce tréponème. Pour nous, ces formes représentent tout simplement un état d'involution ou de dégénérescence précédant la mort du parasite. L'un de nous en

1. BORREL, *C. R. de la Société de Biologie*, vol. XL, 1906, p. 138.

2. SHAUDINN, *Deutsche med. Woch.*, 1905, n° 42.

3. PROWAZEK, *Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, vol. XXVI, fasc. 1, 1907 p. 29.

collaboration avec Manouélian<sup>1</sup>, a déjà exposé autre part dans ces *Annales*, les arguments qui plaident en faveur de cette interprétation.

De plus, nous avons décelé particulièrement dans les cultures conservées un certain temps *in vitro*, la présence de parasites spirillés pourvus d'ondulations de beaucoup plus larges que celles des tréponèmes typiques et contenant une ou plusieurs vacuoles claires limitées par le double contour du périplaste (v. pl. XX, p. 25-26). Les rapports qui existent entre ces formes et le tréponème de Schaudinn n'ont pas été précisés jusqu'à présent.

\* \* \*

Ces constatations montrent l'existence d'une étroite ressemblance entre le spirochète cultivé par nous et le *Treponema pallidum*. Les exemplaires les plus typiques sont impossibles à différencier de ce tréponème, tant au point de vue de leur forme, de leurs dimensions et de la disposition de leurs tours de spire, qu'au point de vue des affinités colorantes. Les individus moins caractéristiques s'écartent sensiblement des pallida typiques. Mais on sait que même parmi les tréponèmes des lésions syphilitiques, on rencontre des exemplaires dont les ondulations sont moins régulières et qui sont sensiblement plus courts ou plus longs que les formes considérées comme caractéristiques. Si cette variabilité paraît plus accentuée chez nos parasites, cela s'explique par le fait qu'il s'agit de cultures, par conséquent de microorganismes soumis à des conditions de vie différentes de celles que le tréponème rencontre dans l'organisme de l'homme ou du singe.

A ne considérer que les caractères morphologiques et les affinités colorantes, on doit donc rapprocher le spirochète cultivé par nous du *Treponema pallidum*. En effet, le seul spirille qui montre certaines affinités avec notre parasite est le *Spirochaeta dentium*<sup>2</sup> cultivé par Mühlens et Hartmann (*loc. cit.*) et étudié par Hoffmann et Prowazek<sup>3</sup>. Or, si l'on se rapporte aux descriptions de ce microbe saprophyte de la cavité buccale, et

1. LEVADITI ET MANOUÉLIAN, ces *Annales*, 1907, vol. XXI, p. 295.

2. Nous éliminons le *Sp. pallidula* du pian, dont il ne saurait être question ici.

3. HOFFMANN ET PROWAZEK, *Centralbl. für Bakter.*, vol. XLI, 1906, fasc. 7, page 74.

si l'on tient compte de nos propres constatations, on doit le séparer nettement du tréponème des cultures. En effet, le *Sp. dentium* est non seulement plus épais, plus irrégulièrement ondulé et moins flexible que ce tréponème, mais, de plus, il se colore plus facilement et d'une façon sensiblement différente de ce dernier. D'ailleurs, on ne saisit pas comment ce microbe saprophyte de la bouche aurait pu infecter des sacs placés dans la cavité péritonéale du singe, le *Sp. dentium* n'ayant jamais été constaté, à notre connaissance, dans les lésions syphilitiques cutanées des cathariniens, lésions qui ont servi de point de départ à nos cultures. Ajoutons qu'il nous a été impossible de cultiver en sacs de collodion le *Sp. dentium* de la salive du *M. cynomolgus*.

Afin de serrer de plus près la question de la parenté entre notre tréponème et celui de la syphilis, nous avons examiné le *pouvoir pathogène* de nos cultures et les *réactions agglutinantes*. Pour ce qui concerne le premier point, nous avons constaté que l'inoculation de notre microbe, par scarification cutanée, pratiquée à deux *Macacus cynomolgus* et à un chimpanzé, n'a été suivie d'aucune manifestation syphilitique locale. Les animaux ayant été soumis à l'observation pendant un temps très long (71 et 88 jours pour les macaques et 42 jours pour le chimpanzé), on peut conclure que le *tréponème des cultures est complètement dépourvu de virulence*<sup>1</sup>. Ajoutons que l'inoculation de ce tréponème dans la cornée du lapin est également restée sans effet<sup>2</sup>.

Pour ce qui a trait à l'agglutination, nous avons constaté tout d'abord que le sérum des lapins ayant reçu, en injection sous-cutanée, des cultures riches en tréponèmes et préalablement chauffées à 60°, agglutinait assez bien ces tréponèmes (dilution au 1/10<sup>e</sup>, 15 minutes de contact à 37°). Cependant, le même sérum s'est montré incapable de provoquer l'agglutination des spirochètes de Shaudinn contenus dans une émulsion de foie d'un hérédo-syphilitique, dont la nécropsie fut pratiquée vingt-quatre heures après la mort.

1. Dans deux expériences faites sur le *cynomolgus*, l'inoculation (par scarification) de nos cultures n'a conféré aucune immunité aux animaux vis-à-vis d'une infection ultérieure avec du matériel syphilitique d'origine humaine.

2. Les animaux ont souvent présenté une kératite et une panoptalmie banales, dues à l'infection par les microbes secondaires.

Ces constatations semblent, au premier abord, être en contradiction avec l'hypothèse de l'identité entre notre tréponème et celui de la syphilis. Leur juste interprétation montre pourtant que cette contradiction n'est que superficielle. En effet, on s'explique fort bien l'atténuation des tréponèmes de Schaudinn cultivés en sacs, si l'on pense qu'il s'agit d'un microbe dont la fragilité est extrême et si l'on tient compte du fait que nos cultures ont eu comme point de départ un chancre de singe, c'est-à-dire une lésion dont les spirochètes étaient très probablement en voie d'atténuation (Metchnikoff et Roux).

De plus, les recherches de Levaditi ont montré que même pour ce qui concerne le *Sp. gallinarum*, microorganisme dont la virulence est de beaucoup plus constante que celle du *pallida*, la culture en sac entraîne une atténuation appréciable de l'activité pathogène du virus. Enfin, la perte de ce pouvoir pathogène peut également s'expliquer par ce que notre tréponème se développe en association avec des anaérobies saprophytes, anaérobies qui, tout en facilitant sa pullulation, peuvent amoindrir ou même annihiler sa virulence.

Quant à l'impossibilité d'agglutiner les spirochètes de l'hérédo-syphilis par un sérum actif vis-à-vis de notre tréponème, c'est là un phénomène qui n'étonne nullement, si l'on tient compte des considérations suivantes : tout d'abord l'agglutination a été pratiquée avec des spirochètes recueillis sur le cadavre, complètement immobiles et même altérés dans leur forme; la sensibilité de ces spirochètes vis-à-vis des principes agglutinants a pu donc être, de par ce fait, annulée. Ensuite, on sait actuellement, depuis les recherches de Landsteiner et Mucha (*loc. cit.*) que le *Treponema pallidum* ne se laisse agglutiner ni par le sérum des malades atteints d'une syphilis plus ou moins ancienne, ni par celui des lapins ayant reçu sous la peau des produits syphilitiques. Enfin, comme nous l'a suggéré M. le professeur Flexner, auquel nous avons exposé nos recherches, il se peut que les tréponèmes puisés directement dans l'organisme de l'homme ou du singe soient devenus inagglutinables, contrairement aux tréponèmes des cultures. Ce serait là un fait ayant des analogies avec l'inagglutinabilité des bacilles typhiques recueillis directement dans le péritoine du cobaye, révélée par Bail et d'autres auteurs.

En somme, et tout en tenant compte des restrictions imposées par l'impossibilité de pousser plus loin l'analyse des caractères vitaux du microbe cultivé par nous, nous pensons qu'au point de vue morphologique, tinctorial et même biologique, notre tréponème doit être rapproché du *Treponema pallidum*. *Le spirochète obtenu en cultures sériées constitue une variété avirulente du parasite de la syphilis, la perte de son activité pathogène étant due aux nouvelles conditions de vie de ce microorganisme et à l'impureté des cultures.*

1<sup>er</sup> septembre 1907.

## LÉGENDE DES PLANCHES

## PLANCHE XIX

*Microphotogrammes.*

*Fig. 1.* — Frottis de foie d'enfant hérédo-syphilitique. Coloration par le procédé de Löffler. Deux tréponèmes pâles.

*Fig. 2.* — Spir. de culture. Col. au Löffler. Forme courte, pourvue d'un cil terminal.

*Fig. 3.* — *Même culture*, même coloration. Au centre un amas de tréponèmes. A comparer le spirochète situé vers le bord gauche de la préparation avec le tréponème représenté dans la figure 4.

*Fig. 4.* — *Même culture*, même coloration. Stade de division transversale du tréponème.

## PLANCHE XX

Dessins à la chambre claire, objectif apochromatique à immersion de Zeis; oculaire compensateur 12; longueur du tube, 16.

*Fig. 1.* — *Treponema pallidum* (frottis de foie hérédo-syphilitique), forme relativement courte, coloration faible au Löffler.

*Fig. 2.* — *Treponema pallidum* (frottis de foie hérédo-syphilitique), forme longue, coloration par le procédé de Löffler.

*Fig. 3.* — Tréponème de culture, forme longue (à comparer avec la figure 2).

*Fig. 4 et 6.* — Tréponème de culture, à extrémités effilées.

*Fig. 5.* — Tréponème de culture; une seule extrémité est effilée.

*Fig. 7.* — Tréponème de culture à extrémités arrondies.

*Fig. 8.* — Tréponème de culture ayant 12 ondulations et des extrémités arrondies.

*Fig. 9.* — Tréponème de culture, forme courte à 2 ondulations.

*Fig. 10.* — *Idem*, à 3 ondulations.

*Fig. 11.* — Tréponème de culture, à ondulations larges, ayant un prolongement ciliaire à une extrémité.

*Fig. 12.* — Tréponème de culture, ayant 9 ondulations régulières et serrées, et les extrémités pointues.

*Fig. 13.* — Forme plus courte, à extrémités effilées.

*Fig. 14.* — Spirochète de culture, ayant un cil allongé à une extrémité, l'autre étant arrondie.

*Fig. 15.* — Spirochète de culture, à 23 ondulations très serrées et pourvu d'un long cil.

*Fig. 16-19.* — Cils du spirochète des cultures.

*Fig. 20.* — Tréponème de culture, coloré au Giemsa.

*Fig. 21.* — *Idem*, coloré au Marino.

*Fig. 22.* — *Idem*, coloré au violet de gentiane.

*Fig. 23-24.* — Division transversale du tréponème des cultures.

*Fig. 25-26.* — Formes à larges ondulations et à vacuoles.

*Fig. 27.* — Forme type de la même préparation.

*Fig. 28.* — Agglutination spontanée des tréponèmes de culture.

*Fig. 29.* — Culture de 9 jours, col. au Loeffler.



# Action de l'extrait de sclérostomes sur le sang de cheval

PAR M. WEINBERG

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Nous avons récemment communiqué à la Société de Biologie<sup>1</sup> le résultat d'une partie de nos recherches sur une hématoxine que nous avons trouvée dans l'extrait de sclérostomes. Ces recherches ont été complétées par un grand nombre d'expériences qui nous ont permis de confirmer les premiers faits et de découvrir d'autres propriétés de l'extrait des helminthes en question.

Les nombreux rapports qui nous semblent exister entre la sclérostomiasis du cheval et l'ankylostomiasis de l'homme augmentent l'intérêt des ces expériences, car nous avons la persuasion que l'étude de la première de ces affections sera d'un précieux secours pour l'étude de l'ankylostomiasis humaine.

Voici résumés brièvement les résultats de nos expériences.

## I. — Propriétés hématoxiques de l'extrait de sclérostomes.

L'extrait de sclérostomes dissout les globules rouges de cheval. Pour constater ce fait, il faut suivre la technique suivante,

On recueille immédiatement, après l'abatage du cheval, des sclérostomes vivants, fixés encore sur la muqueuse du cæcum.

Au début de nos recherches, nous prenions toutes les espèces de sclérostomes que nous rencontrions dans le gros intestin du cheval. Actuellement, nous nous servons surtout des gros spécimens du *Sclerostomum equinum*.

Les vers sont lavés plusieurs fois dans l'eau salée à 7,5/1000 et triturés dans un mortier avec une quantité d'eau physiologique égale à leur poids.

La bouillie ainsi obtenue est jetée sur un filtre ordinaire. Le liquide filtré est d'un gris sale légèrement rougeâtre. Il vaut encore mieux centrifuger cette bouillie pendant 40 minutes environ. On obtient de cette façon beaucoup plus d'extrait.

1. Sur une hématoxine d'origine vermineuse, *C. R. de la Société de Biologie*, séance du 6 juillet 1907.

On ajoute 1, 3 ou 5 gouttes de cet extrait à 10 gouttes de sang de cheval dilué dans de l'eau salée (dans la proportion de 1/20). Ce sang est au préalable désébriné et lavé, par centrifugation, deux ou trois fois dans l'eau salée.

Les tubes contenant le mélange de sang de cheval et d'extrait de sclerostomes sont placés à l'étuve à 37 degrés et sont secoués, pendant quelques secondes, toutes les demi-heures.

Au bout de deux heures, on constate déjà souvent, dans le mélange contenant 5 gouttes d'extrait, une hémolyse complète des globules rouges.

Les tubes sont placés pour la nuit à la glacière. Le lendemain matin, tous les tubes, même ceux qui ne contiennent qu'une seule goutte d'extrait, montrent une hémolyse sinon complète, du moins très marquée.

La présence de l'hématoxine dans l'extrait des clérostomes est donc indiscutable (nous avons répété cette expérience 32 fois) ; elle varie d'intensité, mais elle existe toujours.

Pour nous convaincre que cette substance vient de l'helminthe et non des microbes qu'on trouve en nombre considérable sur son corps, nous avons fait des recherches parallèles avec le contenu filtré du gros intestin du cheval. Nous n'avons jamais obtenu d'hémolyse avec ce produit.

D'autre part, le contenu intestinal des sclerostomes, prélevé directement au moyen d'une pipette effilée, présente les mêmes propriétés hémolysantes que l'extrait de vers.

Cette hématoxine est thermostable ; chauffée pendant une demi-heure et plus à 56-60 degrés, elle conserve ses propriétés. Celles-ci ne sont pas complètement détruites à 100 degrés, à 115 et même à 120 degrés ; l'action hémolytique est alors seulement affaiblie et ralentie.

Passé à travers le filtre Chamberland, l'extrait perd ses propriétés ; il les conserve parfois après filtration sur bougie Berkefeld.

Nous avons également recherché si cette hématoxine est spécifique. Elle ne l'est pas ; elle dissout également les hématies du lapin, du cobaye, du bœuf et du mouton. Elle détruit à peine les globules rouges de l'homme.

Nous avons préparé la poudre avec les sclerostomes desséchés dans le vide. Cette poudre est d'un gris clair et d'une odeur

caractéristique très prononcée. Une petite quantité de cette poudre (15 à 20 centigr.), ajoutée à 10-20 gouttes de sang lavé, dissout les globules rouges très rapidement, parfois en moins d'une heure.

L'extrait éthéré de la poudre de sclérostomes possède également cette propriété de dissoudre les globules rouges.

Pour obtenir l'extrait éthéré, on agite 10 à 15 minutes le mélange de 25 centigrammes de poudre des clérostomes et 10 c.c. d'éther sulfurique. On laisse ce mélange toute une nuit; le lendemain on l'agit quelques minutes, on filtre et le liquide obtenu est évaporé au bain-marie. A la suite de cette opération, il reste au fond du tube une petite masse jaunâtre collée au verre.

On laisse ces tubes pour quelques heures à l'étuve de façon à ce que toute trace d'éther ait disparu.

On verse 10 à 20 gouttes de sang de cheval lavé dans ce tube, on décolle avec une pipette l'extrait fixé au verre et on agite quelques instants le mélange. Le sang est en général hémolysé après 1-2 heures, même à la température de la chambre. Parfois l'hémolyse s'opère beaucoup plus rapidement.

Nous avons également pratiqué deux expériences avec l'extrait alcoolique. Ce dernier n'a pas dissous les globules rouges de cheval.

## II. — *Action comparée des extraits de différentes parties de sclérostomes.*

Pour étudier l'action comparée des différentes parties du sclérostome, il faut procéder de la façon suivante.

On choisit les plus gros spécimens du *Sclerostomum equinum*, on sépare la tête et on coupe la partie terminale de l'extrémité caudale. Dans ces conditions, il n'est pas difficile de retirer du corps de ce parasite son intestin qui se présente sous forme d'un tube d'un rouge noir.

Cette expérience est très minutieuse; nous l'avons répétée trois fois.

Nous avons fait séparément des extraits de têtes, d'intestins et d'enveloppes du parasite avec ou sans organes génitaux.

Dans la première expérience 71 têtes de sclérostomes ont été triturées avec 3 c. c. d'eau physiologique; les intestins et les corps correspondants ont été triturés dans la même quantité d'eau.

Dans la deuxième et troisième expériences, nous avons trituré 100 têtes dans 4 c. c. d'eau physiologique. Il en fut de même pour les autres parties de parasites.

Ces expériences ont montré que l'extrait de têtes hémolyse le sang beaucoup plus rapidement que celui d'intestins. Dans la première expérience, nous avons obtenu une légère hémolyse avec l'extrait de corps. Ce résultat a tenu à ce que nous n'avons pas bien débarrassé l'enveloppe de vers du tube digestif.

Dans les expériences suivantes, où nous n'avons employé que les enveloppes d'helminthes complètement débarrassées de leurs tubes digestifs, nous n'avons pas constaté d'hémolyse.

Ces expériences montrent que c'est surtout la partie céphalique du ver qui contient la substance toxique. L'intestin en sécrète aussi, mais moins.

D'autre part, ayant appris que l'extrait de têtes a les mêmes propriétés que celui de parasites entiers, nous avons remplacé, dans nos expériences ultérieures, le deuxième liquide par le premier, et cela avec un grand avantage, car l'extrait de tête est clair et donne très peu de dépôt lorsqu'il est chauffé.

### III. — *L'extrait de sclérostomes empêche la coagulation du sang de cheval.*

On sait que l'extrait de sangsues empêche la coagulation du sang. D'autre part, Loeb et Smith<sup>1</sup> ont montré que l'extrait d'ankylostomes du chien exerce une certaine action empêchant la coagulation du sang de cet animal.

Nous avons fait une série d'expériences, pour rechercher si

1. LEO LOEB ET A.-J. SMITH, Ueber eine die Blutgerinnung hemmende Substanz in Anchylostoma caninum, *Centralblatt f. Bakt., Parasitenkunde, etc. Originale*, 1904, p. 93-98.

LEO LOEB, Ein weiterer Versuch über die Blutgerinnung hemmende Substanz in Ankylostoma caninum, *Centralblatt f. Bakt. und Paras. Originale*, 1906, p. 740-41.

l'extrait de sclérostomes possède les mêmes propriétés vis-à-vis du sang de cheval.

1<sup>re</sup> *Expérience.* — On recueille dans 5 tubes à essai, contenant chacun 1 c. c. d'extrait de sclérostomes, 1 c. c. de sang de cheval. Cette expérience est faite au moment de l'abatage du cheval; le sang est recueilli à la jugulaire, lorsque le jet se ralentit.

Le sang témoin coagule en 3 minutes. Le sang mélangé à de l'extrait reste incoagulé.

2<sup>e</sup> *Expérience.* — Cinq tubes contenant 2 c. c. d'extrait reçoivent chacun 6 c. c. de sang. Le sang témoin coagule en 12 minutes; le sang traité avec l'extrait reste incoagulé.

3<sup>e</sup> *Expérience.* — On recueille 1 c. c. de sang de cheval dans chacun des 3 tubes contenant 1 c. c. d'extrait de têtes de sclérostomes. Dans deux autres tubes contenant également 1 c. c. du même extrait, on ajoute 1 c. c. de sang.

Le sang témoin coagule en 17 minutes, le sang traité reste incoagulé.

4<sup>e</sup> *Expérience.* — 5 tubes contenant 1 c. c., 1/2 c. c., 3/10 de 1 c. c., 2/10 de 1 c. c., 1/10 de 1 c. c. d'extrait de têtes reçoivent chacun 1 c. c. de sang.

Le sang témoin coagule en 17 minutes, les mélanges de sang et d'extrait restent incoagulés.

5<sup>e</sup> *Expérience.* — Dans un tube contenant 1 c. c. d'extrait de têtes de sclérostomes, on recueille 4 c. c. de sang; dans un autre contenant 1 seule goutte du même extrait, on recueille 1 c. c. 1/2 de sang.

Le sang témoin coagule en 15 minutes; les mélanges restent incoagulables.

6<sup>e</sup> *Expérience.* — On recueille 2 c. c. de sang dans un tube contenant 1 c. c. d'extrait de larves de sclérostomes.

Le sang témoin coagule en 15 minutes; le mélange de sang et d'extrait reste incoagulé.

Tous les tubes contenant le mélange de sang et d'extrait ont été placés au bout d'une heure à la glacière. Tous ces mélanges sont restés incoagulés, même après 4 jours.

Les résultats de ces expériences sont très nets: elles montrent que les sclérostomes sécrètent une substance

toxique ayant la propriété d'empêcher la coagulation du sang de cheval. Cette substance est très active, puisque dans une de nos expériences 1 seule goutte d'extrait de tête a rendu incoagulable 1 c. c. 1/2 de sang.

Il est à noter que l'extrait de larves du même parasite possède également cette propriété.

#### IV. — *Propriétés de l'extrait.*

Nous avons fait deux séries d'expériences pour rechercher si l'extrait de sclerostomes a une action quelconque vis-à-vis du sérum de cheval.

Le sérum de cheval auquel on a ajouté 1 à 5 gouttes d'extrait devient trouble et laisse, le lendemain, un dépôt assez marqué. Il était difficile de tirer une conclusion de ces expériences.

Ayant trouvé que l'extrait de têtes a les mêmes propriétés que l'extrait d'individus entiers, nous avons répété nos expériences avec le premier liquide.

Les expériences pratiquées avec l'extrait de têtes ont donné des résultats très nets.

Le sérum de 9 différents chevaux traité par cet extrait (2, 6, 10 gouttes pour 20 gouttes de sérum) a donné le lendemain un précipité très caractéristique.

L'extrait dont nous nous sommes servi dans cette expérience était très légèrement alcalin. Une alcalinisation forte de cet extrait n'a pas donné lieu à la formation d'un dépôt quelconque.

Cet extrait précipite également le sérum de lapin; il a une action beaucoup moins marquée pour le sérum de cobaye.

#### V. — *Action de l'extrait de larves de sclerostomes.*

Les larves de sclerostomes pénètrent dans le courant circulatoire, se fixent sur le paroi de l'aorte et des grosses artères, ou bien vont se loger sous le péritoine abdominal ou sous la plèvre.

Il était donc important de connaître si les larves, elles aussi, sont capables de sécréter des produits toxiques. En effet, si les larves sécrètent des toxines, celles-ci sont absorbées par l'organisme du cheval, et comme ces parasites

larvaires sont parfois en nombre considérable, elles peuvent amener des troubles très sérieux.

Les larves sont recueillies dans les nodules sous-périto-néaux, lavées deux ou trois fois dans l'eau salée et triturées avec une quantité d'eau physiologique égale à leur poids.

3 séries d'expériences ont été instituées avec l'extrait simple ; nous avons toujours obtenu une légère hémolyse dans les mélanges de 5 gouttes d'extrait pour 10 gouttes de sang.

Une quatrième série d'expériences a été faite avec l'extrait de têtes de larves. 73 têtes de larves ont été triturées dans 3 c. c. d'eau physiologique. L'extrait ainsi obtenu a donné une légère hémolyse comme l'extrait de larves entières.

Nous avons vu plus haut que l'extrait de larves a aussi une action empêchante sur la coagulation du sang.

## VI. — *Action empêchante du sérum de cheval.*

Nous avons recherché si le sérum de cheval empêche l'action de l'extrait de sclérostomes sur les globules rouges. Dans ce but, nous avons pratiqué de nombreuses expériences avec 2 échantillons de sérum.

Le sérum de cheval n'empêche pas l'hémolyse des globules rouges par l'extrait simple ni par l'extrait chauffé à 56°. Par contre, il a une action très nette sur l'extrait bouilli ou stérilisé à 115°. Dans ces expériences, nous avons ajouté aux globules rouges autant de gouttes d'extrait (1, 3, 5 gouttes) que de sérum.

Le sérum chauffé (à 56° pendant 1/2 heure) possède une action empêchante un peu plus prononcée ; son action se manifeste déjà vis-à-vis de l'extrait chauffé à 56°.

Les globules rouges soumis à l'action combinée de l'extrait et du sérum chauffé à 56° montrent une hémolyse moins marquée que lorsqu'on les traite par le mélange d'extrait non chauffé et de sérum chauffé.

Le sérum de lapin chauffé empêche également l'action de l'extrait de sclérostomes bouilli ou stérilisé, mais d'une façon beaucoup moins marquée que le sérum de cheval.

Il en est de même pour le sérum de cobaye.

VII. — *Étude des extraits d'autres vers intestinaux.*

Il était intéressant d'établir si les extraits d'autres helminthes qu'on trouve souvent dans l'intestin du cheval possèdent les mêmes propriétés.

Nous avons porté nos recherches sur l'oxyure, l'ascaride et les ténias.

a) *Oxyuris equi*. *Expérience 1.* — 2 grammes d'oxyures sont triturés avec 2 c. c. d'eau physiologique. On verse 1, 3, 5 gouttes d'extrait dans les tubes contenant chacun 10 gouttes de sang lavé. Le sang n'est pas hémolysé même au bout d'une nuit passée à la glacière.

*Expérience 2.* — 12 grammes d'oxyures sont triturés avec 12 c. c. d'eau physiologique. On prépare 5 séries de 4 tubes avec du sang lavé; on ajoute 1, 3, 5 et 10 gouttes d'extrait. Pas d'hémolyse.

*Expérience 3.* — Le même résultat négatif a été obtenu dans la troisième série d'expériences où nous avons ajouté au sang lavé 1, 3, 5 gouttes d'extrait;

b) *Ascaris megalocephala*. — Nous avons pratiqué 7 expériences avec l'extrait d'ascarides provenant de l'intestin grêle de différents chevaux.

Dans les 3 premières expériences nous avons obtenu une légère hémolyse dans les tubes où 10 gouttes de sang ont été mélangées à 10 gouttes d'extrait.

Nous avons répété ces expériences après avoir débarrassé les parasites en question du contenu intestinal du cheval, en les soumettant aux 3 lavages successifs dans l'eau physiologique.

Les quatre nouvelles séries d'expériences ont donné des résultats négatifs.

Comme l'intestin d'ascaride contient en général une certaine quantité de liquide, nous avons broyé ces parasites sans y ajouter d'eau physiologique. La bouillie obtenue était centrifugée tantôt immédiatement, tantôt après quelques heures de séjour à la glacière;

c) *Tenia perfoliata*. — Les ténias de cette espèce, qu'on trouve souvent en grand nombre dans le cæcum du cheval, ont

étaient soigneusement lavés dans l'eau physiologique et triturés avec la quantité d'eau égale à leur poids.

Nous avons pratiqué 4 séries d'expériences. Les parasites qui nous ont servi à chaque expérience provenaient d'un cheval différent.

Les résultats de toutes nos expériences ont été négatifs. L'extrait de ces ténias n'hémolyse pas les globules rouges de cheval, même dans la proportion de 10 gouttes d'extrait pour 10 gouttes de sang ;

d) *Ternia plicata*. — Ce parasite habite l'intestin grêle du cheval. Il est assez rare. Nous en avons trouvé dernièrement un seul exemplaire qui pesait 2<sup>gr</sup>,50. Ce ver a été trituré dans 5 c.c. d'eau physiologique.

Il a été versé 2, 6, 10 gouttes de l'extrait ainsi obtenu dans 3 tubes contenant chacun 10 gouttes de sang.

Les globules rouges sont restés intacts.

#### CONCLUSIONS

1. L'extrait de sclérostomes du cheval possède la propriété de dissoudre les globules rouges de cet animal.

2. Cette hématoxine est sécrétée surtout par la partie céphalique du parasite, mais aussi par son tube digestif.

3. Cette hématoxine est thermostable. Elle n'est pas complètement détruite, même chauffée à 115-120 degrés pendant 15 à 20 minutes.

4. Elle n'est pas spécifique, elle dissout en même temps les globules rouges d'autres animaux (cobaye, lapin, bœuf, mouton).

5. Les sclérostomes sécrètent également une substance ayant les propriétés de précipitines à l'égard du sérum de cheval. Cette toxine n'est pas spécifique ; elle précipite aussi le sérum de lapin.

6. L'extrait de larves de sclérostomes possède les mêmes propriétés que celui d'individus adultes, mais son action est moins marquée.

7. Le sérum de cheval empêche l'action de l'extrait bouilli ou stérilisé sur les globules rouges de cheval. Le sérum de cheval chauffé (à 56° pendant 1/2 heure) est plus actif et son

action se manifeste même vis-à-vis de l'extrait chauffé à 56°.

8. Les autres helminthes qu'on trouve dans l'intestin du cheval (*Oxyuris equi*, *Ascaris megalocephala*, *Taenia perfoliatia*, *Taenia plicata*) ne sécrètent pas une hématoxine pour les globules rouges de cet équidé.

Il semble découler des expériences que nous avons relatées dans ce travail que, des divers parasites intestinaux du cheval, le seul capable de sécréter une hématoxine est aussi le seul qui se nourrit du sang de l'animal dont il est l'hôte.

Nous avons commencé des expériences en vue d'étudier l'action de ces substances sur l'organisme animal. Ces expériences seront publiées ultérieurement.

# ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR l'association du Spirille de la Tick-fever et de divers Trypanosomes

PAR LE DR R. TRAUTMANN

MÉDECIN DES TROUPES COLONIALES

(Travail du laboratoire de M. Mesnil.)

---

Les recherches faites ces dernières années ont établi que les différents trypanosomes, sauf le *Trypan. lewisi*, sont assez facilement influencés par diverses substances chimiques : arsenicaux, couleurs de benzidine, etc.

D'autre part, il semble résulter des travaux de quelques auteurs (Nissle, Thomas et Breinl, Massaglia, Rodet et Vallet, etc.), que certaines bactéries ont une action générale (cas de septicémie microbienne) ou locale (cas d'abcès) sur les infections à trypanosomes, mais aucune étude méthodique n'en a été faite. Il est malheureusement difficile de régler l'action de ces bactéries, et surtout d'arriver à obtenir une action prolongée des microbes vivant côté à côté dans le sang avec les trypanosomes.

L'idée nous est venue de rechercher si les spirilles — dont l'évolution, chez l'organisme vivant, rappelle à tant d'égards celle des trypanosomes pathogènes — n'exerceraient pas une action analogue.

Nous nous sommes servi du spirille de la Tick-fever, qui a l'avantage de provoquer chez les animaux, et en particulier chez la souris, des affections à récurrence.

Toutes nos expériences ont été faites sous la direction de M. Mesnil, à l'Institut Pasteur.

Les premières recherches portèrent sur l'association du spirille et du *Trypan. gambiense* ; les résultats ne purent en être appréciés avec certitude, l'affection à *gambiense* étant souvent longue et très irrégulière chez la souris. Nous avons employé ensuite le trypan. de la Dourine, ceux du Surra et du Nagana.

Le Nagana (virus de passage par souris, de l'Institut Pasteur) présente l'avantage de fournir une infection rapide et

sûre; il tue régulièrement la souris, par inoculation sous la peau, en 4 jours 1/2, 5 jours, 6 jours au maximum. D'autre part, depuis le moment de leur apparition dans le sang, les trypan. y augmentent d'une façon continue, sans qu'on constate jamais la moindre régression.

#### TICK-FEVER ET NAGANA

Les résultats ont sensiblement différencié, suivant le mode d'administration des deux virus; aussi avons-nous fait trois séries d'expériences, donnant les spirilles avant les trypan., après, ou en même temps qu'eux.

#### EXPÉRIENCE A

Le même jour et à la même heure :

Nagana sous la peau du dos { à 3 souris.

Spirilles dans le péritoine { à 3 souris.

Nagana sous la peau du dos à 1 souris témoin.

DATES	SOURIS I		SOURIS II		SOURIS III		TÉMOIN
	Trypan.	Spirilles	Trypan.	Spirilles	Trypan.	Spirilles	
16 h. soir							
1 <sup>er</sup> jour	0	R	0	R	0	0	0
2 <sup>e</sup> —	0	NR	0	R	0	R	0
3 <sup>e</sup> —	0	N	2	N	1	N	0
4 <sup>e</sup> —	3	NR	TR	TR	TR	TN	NR
5 <sup>e</sup> —	4	0	1	0		+	N
6 <sup>e</sup> —	TR	0	0	0			+ (5 <sup>e</sup> - 6 <sup>e</sup> )
7 <sup>e</sup> —	0	1	2	0			
8 <sup>e</sup> —	0	TR	2	1			
9 <sup>e</sup> —	TR	NR	TR	0			
10 <sup>e</sup> —		+	NR	0			
12 <sup>e</sup> —			+				

I signifie inoculation

*Note.* — Pour toutes nos expériences, les abréviations employées indiquent le nombre de parasites vus dans une goutte de sang examiné à l'état frais, et ont la valeur suivante :

O : aucun parasite.

TR : un — vu toutes les 5 minutes.

R : 3-4 — vus en 2 minutes.

AR : 1 — pour 3 à 4 champs.

NR : 1-2 — par champ.

AN : 10 — environ par champ.

N : moitié moins de parasites que de globules.

TN : autant — — —

EN : plus — — —

L'indication + indique la mort survenue dans la journée; celle + (5<sup>e</sup> - 6<sup>e</sup>) par exemple, indique que la mort est survenue dans la nuit du 5<sup>e</sup> au 6<sup>e</sup> jour.

Le tableau ci-dessus indique la marche de la maladie chez les quatre animaux.

Le témoin est tué en 5 j. 1/2 (évolution normale du Nagana).

La mort de la souris III, survenue le 4<sup>e</sup> jour, peut, vraisemblablement, être attribuée aux spirilles, une proportion assez forte d'animaux succombant lorsque ces parasites sont très nombreux dans la circulation.

Les souris I et II ont survécu 4 j. 1/2 et 6 j. 1/2 au témoin : on constate, le 7<sup>e</sup> jour pour la souris I, le 5<sup>e</sup> pour la souris II, une diminution dans le nombre des trypan. Or, ce phénomène ne s'observe jamais quand le Nagana est inoculé seul.

D'autre part, la mort de ces deux souris est survenue sans que les trypan. se soient montrés en quantité suffisante pour que leur présence seule la justifie. Nous verrons, en effet, par la suite, que ni l'association de trypan. plus ou moins rares et de spirilles non rares, ni l'existence de trypan. non rares seuls, ne constituent, en règle générale, une cause de mort; celle-ci n'arrive normalement qu'au moment où les trypan. sont très nombreux dans le sang.

### EXPÉRIENCE B.

Le même jour et à la même heure :

Nagana et spirilles, en mélange, dans le péritoine à 3 souris.

Témoin. { Nagana dans le péritoine à 4 souris.  
Spirilles dans le péritoine à 4 souris.

DATES	TÉMOIN		SOURIS I		SOURIS II		SOURIS III	
	à Spirilles.	à Nagana.	Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.
<b>11 h matin.</b>								
1 <sup>er</sup> jour.	NR	AN	N	R	AR	O	N	R
2 <sup>e</sup> —	N	TN + (2 <sup>h</sup> )	TN	AN	AN	AR	AN	NR
3 <sup>e</sup> —	AN			+ (2 <sup>e</sup> -3 <sup>e</sup> )	TN	N	TR	N
4 <sup>e</sup> —	N						O	O
5 <sup>e</sup> —	TR						2	0
6 <sup>e</sup> —	O						O	O
7 <sup>e</sup> —	NR						O	O
8 <sup>e</sup> —	N						TR	O
9 <sup>e</sup> —	AN						O	O
10 <sup>e</sup> —	TR						1	O
11 <sup>e</sup> —	O						1	O
12 <sup>e</sup> —	O						R	O
14 <sup>e</sup> —	N						N	TN
15 <sup>e</sup> —	N							+ (14 <sup>e</sup> -15 <sup>e</sup> )
16 <sup>e</sup> —	O	etc.						

Le témoin à Nagana meurt en 52 heures exactement.

Le témoin à spirilles présente une évolution normale de la maladie, avec deux crises.

Chez la souris I, où l'évolution du Nagana semble cependant plus rapide que chez le témoin, la mort arrive seulement dans la nuit du 2<sup>e</sup> au 3<sup>e</sup> jour.

Chez la souris II, on constate un retard plus marqué, puisqu'elle ne succombe qu'au bout de 74 heures.

Enfin, la souris III résiste et présente le phénomène de régression des trypan., déjà signalé chez les souris I et II de l'expérience A. Nous nous étendrons plus loin sur l'évolution anormale des spirilles chez cette souris. Elle meurt dans la nuit du 14<sup>e</sup> au 15<sup>e</sup> jour, soit un retard de 42 j. 1/2 sur la mort du témoin.

### EXPÉRIENCE C.

Le même jour et à la même heure :

Nagana et spirilles, en mélange sous la peau à 2 souris (I et II.)

Nagana sous la peau et spirilles dans le péritoine à 2 souris (III et IV.)

Témoin } Nagana sous la peau à 1 souris.  
Spirilles } Spirilles dans le péritoine à 1 souris.

DATES	SOURIS I		SOURIS II		SOURIS III		SOURIS IV		Témoin à Trypan.	Témoin à Spirilles
	Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.		
111 h. 1/2 ma <sup>j</sup> .										
1 <sup>er</sup> jour.	4	TR	TR	AR	TR	AR	TR	AR	TR	NR
2 <sup>e</sup>	TR	AN	NR	TN	NR	TN	AR	N	NR	TN
3 <sup>e</sup> --	NR	TN	AN	TN	AN	TN	AR	N	N	TN
4 <sup>e</sup> --	AN	TN	4- (3 <sup>e</sup> + 4 <sup>e</sup> )	N	TN	TR	O	TN	AN	
5 <sup>e</sup>	N	O			4- (4 <sup>e</sup> + 5 <sup>e</sup> )	O	O	4 (14 <sup>e</sup> )	O	
6 <sup>e</sup> --	TR	O				O	O			+
7 <sup>e</sup> --	TR	R				R	TR			
8 <sup>e</sup>	NR	AN				O	O			
9 <sup>e</sup> --	AN	N				NR	O			
11 <sup>e</sup>	N	R				N	O			
12 <sup>e</sup>	NR	NR				4 (24 <sup>e</sup> )				
13 <sup>e</sup> --	4- (24 <sup>e</sup> )									

La mort du témoin à Nagana arrive en 97 heures 1/2.

Celle des souris II et III semble devoir être rattachée surtout à la présence de très nombreux spirilles dans le sang; celle du témoin à spirilles, à une affection banale n'ayant aucun rapport avec la spirillose.

Les souris I et IV voient leur maladie évoluer, à peu de chose près, comme celle des souris résistantes des expériences A et B.

Nous remarquerons simplement ici, pour y insister plus tard, que la souris I, présentant une évolution normale de spirilles, semble réagir moins bien aux trypan. que la souris IV, chez laquelle l'infection à spirilles se fait d'une façon anormale.

Cependant, la mort de celle-ci se produit la première, au 12<sup>e</sup> jour, soit 7 jours plus tard que celle du témoin.

La souris I meurt le 13<sup>e</sup> jour à 2 heures, sans présenter dans le sang une grande quantité de parasites, soit 8 j. 1/2 après le témoin.

### EXPÉRIENCE D

Nagana sous la peau à 5 souris.

Le lendemain spirilles dans le péritoïne à 4 d'entre elles.

DATES	SOURIS I		SOURIS II		SOURIS III		SOURIS IV		TÉMOIN — Trypan.
	Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	
Inoc. Nagana									
1 <sup>er</sup> jour Inoc.									
Spirilles	0		0		0		0		0
2 <sup>e</sup> jour	1	TR	0	AN	2	AR	0	R	0
3 <sup>e</sup> —	4	NR	TR	AN	TR	AN	1	AN	2
			+(3 <sup>e</sup> - 4 <sup>e</sup> )						
4 <sup>e</sup> —	AR	AN	1	AN	NR	N	TR	TN	N
5 <sup>e</sup> —	NR	0			AN	AN	NR	TN	+(4 <sup>e</sup> - 5 <sup>e</sup> )
6 <sup>e</sup> —	1	0			TR	0			
7 <sup>e</sup> —	0	0			4	0			
8 <sup>e</sup> —	0	0			1	2			
9 <sup>e</sup> —	3	0			AR	0			
10 <sup>e</sup> —	3	2			AN	AR			
11 <sup>e</sup> —	1	4			AR	NR			
13 <sup>e</sup> —	4	0			0	0			
14 <sup>e</sup> —	1	0			AR	0			
15 <sup>e</sup> —	1	0			NR	0			
16 <sup>e</sup> —	TR	AR			AN	0			
17 <sup>e</sup> —	0	AR			TR	NR			
18 <sup>e</sup> —	0	TR			0	0			
20 <sup>e</sup> —	0	0			0	0			
21 <sup>e</sup> —	0	0			3	0			
22 <sup>e</sup> —	0	0			R	0			
24 <sup>e</sup> —	R	0			AN	0			
25 <sup>e</sup> —	AN	0			AN	0			
26 <sup>e</sup> —	AN	0			AN	0			
27 <sup>e</sup> —	NN	0			NR	0			
28 <sup>e</sup> —	NN	R			R	0			
29 <sup>e</sup> —	R	AR			NR	AN			
30 <sup>e</sup> —	0	0			NR	0			
31 <sup>e</sup> —	1	0			N	0			
32 <sup>e</sup> —	2	0			TN	0			
33 <sup>e</sup> —	1	0			TN	0			
34 <sup>e</sup> —	NR	0			+(33 <sup>e</sup> - 34 <sup>e</sup> )				
35 <sup>e</sup> —	N	0							
36 <sup>e</sup> —	TN	0							
		+(36 <sup>e</sup> - 37 <sup>e</sup> )							

C'est ce mode d'inoculation qui nous a donné les résultats les plus satisfaisants et nous a permis de conserver 33 et 36 jours deux des souris naganées.

Le témoin meurt en 4 jours 1/2; la souris II en 3 jours 1/2, probablement de maladie intercurrente (avec très rares Trypan. et sp. assez nombreux seulement); la souris IV en 4 jours 1/2, de spirillose, vraisemblablement.

La marche de la maladie a été identique chez les souris I et III; aux mêmes époques, à peu près, Trypan. et spirilles augmentent ou diminuent chez ces deux animaux :

C'est d'abord une régression des Trypan. survenant au 6<sup>e</sup> jour chez les deux souris, suivie d'une disparition complète pendant 2 jours pour la souris I, partielle pour la souris II.

Le 9<sup>e</sup> jour, le nombre des Trypan. augmente légèrement, chez la première, sensiblement chez la seconde. Jusqu'au 16<sup>e</sup> jour, pour l'une, au 17<sup>e</sup> pour l'autre, ces parasites sont présents dans la circulation en quantité plus ou moins grande.

A ces dates, ils disparaissent une deuxième fois, et les examens de sang sont négatifs pendant 6 jours (souris I) et 2 jours (souris II).

La marche des deux infections, jusque-là parallèles, diffère alors légèrement.

Pour la souris I, les Trypan. se montrent à nouveau le 24<sup>e</sup> jour, augmentent régulièrement jusqu'au 28<sup>e</sup>, diminuent le 29<sup>e</sup>, pour tomber à 0 le 30<sup>e</sup>. Le lendemain et les deux jours suivants, l'examen décèle 1 à 2 Trypan. Le 34<sup>e</sup> jour, leur nombre augmente brusquement et la mort survient dans la nuit du 36<sup>e</sup> au 37<sup>e</sup> jour, avec une très grande quantité de Trypan. dans le sang.

Pour la souris II, dès le 21<sup>e</sup> jour, réapparition des Trypan., dont le nombre croît rapidement, pour diminuer une dernière fois le 28<sup>e</sup> jour et s'élèver ensuite jusqu'à l'époque de la mort, dans la nuit du 33<sup>e</sup> au 34<sup>e</sup> jour (Trypan. très nombreux).

Si nous examinons maintenant l'infection à spirilles, nous sommes frappés de son irrégularité et de son peu d'intensité; mais, la particularité la plus marquante est l'apparition anormale de spirilles, les 27<sup>e</sup> et 28<sup>e</sup> jours après l'infection (3<sup>e</sup> récidive).

Nous n'avons jamais observé ce phénomène chez les animaux infectés de spirilles seulement; par contre, nous l'avons relevé chez d'autres souris, inoculées de Trypanosomes et de Spirilles dans des conditions différentes.

## EXPÉRIENCE E

Nagana sous la peau à 4 souris.

Le lendemain spirilles dans le péritoine à 3 d'entre elles.

Les 8<sup>e</sup>, 9<sup>e</sup> et 14<sup>me</sup> jours, réinoculation de spirilles à la souris II.

DATES	INOCULATIONS	SOURIS I		SOURIS II		SOURIS III		TÉMOIN — Trypan.
		Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	
3 h. 1/2 soir	Inoculat. Nagana p <sup>r</sup> au dos.							
1 <sup>er</sup> jour	Spir. dans péritoine aux souris I-III.	R	NR	R	AR	NR	NR	AR
2 <sup>e</sup> —		AR	AN	NR	N	AN	N	AN
3 <sup>e</sup> —		4	N	AR	N	TN	N	
4 <sup>e</sup> —		4	0	AR	0			+ (3 <sup>e</sup> - 4 <sup>e</sup> )
5 <sup>e</sup> —						+	(1 h.)	
6 <sup>e</sup> —		4	0	0	0			
7 <sup>e</sup> —		0	0	TR	0			
8 <sup>e</sup> —	I. Spir. pér. à II.	R	2	AR	0			
10 <sup>e</sup> —	— —	NR	NR	NR	TR			
11 <sup>e</sup> —		4	0	4	0			
12 <sup>e</sup> —		4	0	0	0			
14 <sup>e</sup> —	I. Spir. pér. à II.	AR	0	TR	0			
15 <sup>e</sup> —		N	0	N	0			
16 <sup>e</sup> —		N	0	4	0			
17 <sup>e</sup> —		TN	0	0	0			
18 <sup>e</sup> —		NR	NR	0	0			
19 <sup>e</sup> —		0	0	0	0			
20 <sup>e</sup> —		0	0	4	2			
21 <sup>e</sup> —		4	0	2	0			
22 <sup>e</sup> —		2	0	0	0			
23 <sup>e</sup> —		AR	0	TR	0			
24 <sup>e</sup> —		AR	0	TR	0			
25 <sup>e</sup> —		AR	0	TR	0			
26 <sup>e</sup> —		NR	0	NR	0			
27 <sup>e</sup> —		+ (Midi)		AN	0			
28 <sup>e</sup> —				AN	0			
29 <sup>e</sup> —				N	0			
30 <sup>e</sup> —				+ (1 h.)				

Cette expérience est en partie la répétition et la confirmation de la précédente. L'inoculation a été cette fois plus massive. Le témoin meurt en 3 jours 1/2; la souris III en 4 jours avec des Trypan. très nombreux, malgré l'inoculation de spirilles.

Nous n'insisterons pas sur l'évolution des deux parasites, qui a eu lieu, à peu de chose près, comme dans l'expérience D.

La souris II a été inoculée à trois reprises de spirilles dans le péritoine (8<sup>e</sup>, 9<sup>e</sup> et 14<sup>e</sup> jours) et nous n'avons constaté, à la suite des réinjections, aucune modification dans la marche de la maladie. La souris I est morte le 27<sup>e</sup> jour, la souris II le 30<sup>e</sup> jour.

## EXPÉRIENCE F

Spirilles dans le péritoine à 2 souris.

Le lendemain Nagana sous la peau à ces deux et à un témoin.

DATES	INOCULATIONS	SOURIS I		SOURIS II		TÉMOIN
		Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	
4 h. 1/2 soir.	Spirilles péritoine à souris I et II.					
Lendemain 5 h. 1/2 soir.	Nagana sous la peau aux 3 souris.					
1 <sup>er</sup> jour....		O	TN	O	TN	O
2 <sup>e</sup> — ....		O	EN	O	EN	O
3 <sup>e</sup> — ....		O	EN	O	TN	O
4 <sup>e</sup> — ....		+	(3 <sup>e</sup> 4 <sup>e</sup> )	TR	N	NR
5 <sup>e</sup> — ....				R	O	N
6 <sup>e</sup> — ....				AN	O	+
7 <sup>e</sup> — ....				TN	O	
8 <sup>e</sup> — ....				+	(4 h. soir.)	

Le témoin meurt dans la nuit du 5<sup>e</sup> au 6<sup>e</sup> jour après l'inoculation de Nagana.

L'abondance extrême de spirilles cause la mort de la souris I (les Trypan. n'ont pas eu le temps d'apparaître). La souris II ne dépasse pas le 8<sup>e</sup> jour et le tableau rend compte qu'il n'y a pas eu régression des Trypanosomes.

## EXPÉRIENCE G.

Spirilles dans le péritoine à 2 souris.

Le lendemain, Nagana dans le péritoine à ces deux et à un témoin.

DATES	INOCULATIONS	SOURIS I		SOURIS II		TÉMOIN Tryp.
		Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	
4 h. 1/2 soir.	Spirilles dans le péritoine à souris I et II.					
Lendemain 5 h. soir.	Nagana dans le péritoine aux trois.					
1 <sup>er</sup> jour....		O	TN	O	TN	O
2 <sup>e</sup> — ....		O	EN	I	EN	AR
3 <sup>e</sup> — ....		TR	EN	TR	EN	N
4 <sup>e</sup> — ....		AR	TN	AR	TN	+ (3 <sup>e</sup> -4 <sup>e</sup> )
5 <sup>e</sup> — ....		AN	O	AN	O	
6 <sup>e</sup> — ....		TN	O	N	O	
7 <sup>e</sup> — ....		EN	O	TN	O	
8 <sup>e</sup> — ....		+ (7 <sup>e</sup> -8 <sup>e</sup> )		EN	O	
9 <sup>e</sup> — ....				+ (8 <sup>e</sup> -9 <sup>e</sup> )		

Comme dans l'expérience précédente, il est à remarquer que l'infection à Trypan. a suivi une marche régulièrement progressive, mais ralentie, jusqu'à la mort des deux animaux.

Il paraît donc évident, d'après les expériences précédentes, que, dans la majorité des cas, l'action des spirilles n'est pas douteuse et gêne le développement des Trypan. Quelle peut être la raison de cette action empêchante? L'immunité acquise par les souris contre les spirilles influence-t-elle les Trypan. ? Pour élucider cette question, nous avons fait l'expérience.

#### EXPÉRIENCE H.

Le même jour et à la même heure :

De 3 souris ayant acquis l'immunité pour les spirilles, l'une est inoculée de spirilles dans le péritoine (souris I); l'autre de spirilles dans le péritoine et de Nagana sous la peau (souris II); la 3<sup>e</sup> de Nagana sous la peau (souris III).

De 3 souris neuves, l'une est inoculée de spirilles dans le péritoine (souris IV); l'autre de Nagana sous la peau (souris V); la 3<sup>e</sup> de spirilles dans le péritoine et de Nagana sous la peau (souris VI).

DATES	INOCULATIONS	SOURIS I		SOURIS II		SOURIS III		SOURIS IV		SOURIS V		SOURIS VI	
		Spir.	Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	Tryp.	Spir.	Trypan.	Spir.	Tryp.	Spir.	Tryp.
5 h. 1/4 soir	Nagana sous la peau à souris II, III, V et VI. Spirilles dans le péritoine à souris I, II, IV et VI.												
1 <sup>er</sup> jour		0	0	0	0			AN	0	0	NR		
2 <sup>e</sup> —		0	0	0	0			N	0	0	N		+ (2-3 <sup>e</sup> )
3 <sup>e</sup> —		0	0	0	0			N	0				
4 <sup>e</sup> —		0	AR	0	I			TR	AR				
5 <sup>e</sup> —		0	N	0	AR			0	N				
6 <sup>e</sup> —		0	TN	0	N			0	TN				
7 <sup>e</sup> —		0	etc.			TN		0			+ (mid)		
8 <sup>e</sup> —						+ (1 <sup>h</sup> )			NR				
9 <sup>e</sup> —									AR				
10 <sup>e</sup> —									0				
11 <sup>e</sup> —									0				
12 <sup>e</sup> —									0				
13 <sup>e</sup> —									0				
14 <sup>e</sup> —									R				
15 <sup>e</sup> —									0		etc.		

Comme il fallait s'y attendre, les souris I et II n'ont pas réagi à la nouvelle inoculation de spirilles.

La souris IV a fait une spirillose normale.

La souris VI succombe en 2 jours 1/2, sans présenter de Trypan.

Les souris V et VI meurent en 3 jours 1/2; la souris III en 6 jours 1/2<sup>1</sup>.

L'immunité de la souris contre les spirilles n'empêche donc pas le Nagana d'évoluer normalement chez elle.

L'expérience précédente nous montre que l'immunité des animaux contre les spirilles est insuffisante pour expliquer la disparition des Trypan. à certains moments. Il est donc permis de penser qu'il peut y avoir une action toxique des spirilles pour les Trypan. Voyons-le dans l'expérience suivante.

#### EXPÉRIENCE I.

Nagana dans le péritoine à 3 souris.

Le lendemain, inoculation d'un culot de spirilles morts dans le péritoine des deux premières.

1. — Toutes les inoculations faites à la même époque dans le laboratoire de M. Measnil, avec le Nagana, amènèrent la mort des souris en un temps variant de 5 jours à 6 jours 1/2, c'est-à-dire avec un retard de 24 heures environ sur le temps normal.

Le culot de spirilles a été fourni par un gros rat saigné à blanc 4 jours après une inoculation de spirilles dans le péritoine, et présentant, au moment où il a été tué, des parasites nombreux dans la circulation. Le sang prélevé a été défibriné, puis centrifugé pendant 1 heure. Le culot obtenu, placé dans 1 c. c. d'eau physiologique, a été inoculé après un chauffage de 10 minutes à 56°.

L'action des spirilles morts a été nulle : le témoin est mort dans la nuit du 3<sup>e</sup> au 4<sup>e</sup> jour comme l'une des souris ; l'autre avait succombé le 3<sup>e</sup> jour à 4 heures. Les 3 animaux présentaient des Trypan. très nombreux.

\* \*

Telles ont été les principales expériences faites. Il s'en dégage, comme fait saillant, que, dans la majorité des cas, la présence de spirilles vivants, chez une souris naganée, retarde la mort de celle-ci.

La survie des animaux nous paraît relever d'une double action exercée par les spirilles sur les Trypanosomes :

1<sup>o</sup> Une gêne apportée au développement de ces derniers ;

2<sup>o</sup> Une diminution de leur virulence vis-à vis de l'animal en expérience.

La gêne apportée au développement des Trypan. est visible dans presque toutes nos expériences : nos témoins montrent, en effet, que le Nagana étant inoculé seul, les parasites mettent un temps très court pour passer de très rares à nombreux ou très nombreux. Quand, au contraire, des spirilles ont été inoculés, soit en même temps que les Trypan., soit avant ou après eux, il faut, en règle générale, un laps de temps beaucoup plus considérable pour observer dans la circulation une grande quantité de Trypan. ; quelquefois même, la souris meurt sans que ceux-ci dépassent 1 à 2 par champ. (Exp. A, C, E.)

D'autre part, chez les témoins, dès que les Trypan. deviennent très nombreux, la souris meurt brusquement, et il est rare de voir un animal résister plus d'un jour, lorsqu'il présente dans son sang une grande quantité de parasites.

Or, dans plusieurs de nos expériences, des souris sont mortes après avoir présenté pendant plus de 2 jours des Trypan. très nombreux ou même excessivement nombreux. Cette constatation fait songer à une diminution de virulence de Trypan., mais il n'y a pas atténuation durable, comme nous le verrons plus loin.

Le manque de temps nous a empêché de poursuivre l'explication du phénomène.

Les deux seules expériences que nous avons faites à ce sujet (Exp. H et I) nous montrent qu'il ne faut la chercher ni dans l'immunité des animaux contre les spirilles ni dans l'action toxique des spirilles morts sur les Trypan.

Nous restons toujours en présence du même fait inexplicable, mais qui n'en est pas moins intéressant, c'est qu'une affection agit nettement sur l'autre. Chaque nouvelle poussée de spirilles, chez nos souris à longue survie, semble coïncider avec une régression du Trypan.

C'est sans doute à cette régression périodique qu'il faut attribuer le retard survenu dans la mort, peut-être parce que, à chaque nouvelle reprise, la souris se trouve dans des conditions de défense équivalentes à celle où elle se trouvait au moment de la première infection.

En tout cas, ce n'est pas à une atténuation vraie de virulence du Trypan qu'il faut l'attribuer : les expériences suivantes le prouvent.

Une souris neuve est inoculée avec du Nagana provenant de la souris III de l'expérience D ; elle meurt en 4 jours 1/2.

La veille de sa mort, il lui est fait une prise de sang qui est inoculé à une souris neuve ; celle-ci succombe également en 4 jours 1/2.

Avec cette dernière souris, au 4<sup>e</sup> jour de l'infection, un troisième animal inoculé meurt aussi en 4 jours 1/2.

Dans ces trois cas, l'évolution du Nagana a été absolument normale.

Nous croyons pouvoir en conclure que le virus n'a subi aucune atténuation durable par le contact prolongé avec les spirilles.

Ces trypan. qui ne sont pas atténués et qui ont vécu ainsi en contact avec les spirilles, comment se comportent-ils en association avec de nouveaux spirilles chez des animaux neufs ?

Pour nous en rendre compte, nous avons établi les expériences suivantes :

1. — Avec du sang provenant de la souris III, Exp. D, au 34<sup>e</sup> jour de l'infection, nous avons inoculé 3 souris, sous la peau, et, pour réaliser les mêmes conditions que dans ladite expérience D, le lendemain nous avons injecté des Spirilles dans le péritoine. Les souris réagissent toutes ainsi :

	Trypanosomes	Spirilles
2 <sup>e</sup> jour	TR	NR
3 <sup>e</sup> " "	NR	N
4 <sup>e</sup> "	N	TN
5 <sup>e</sup> "	N	NR

Mort dans la nuit du 5<sup>e</sup> au 6<sup>e</sup> jour.

Les Trypan. semblent donc vaccinés contre les spirilles.

Cependant nous allons voir que, dans l'expérience suivante, une souris fait exception.

2. — Une souris neuve reçoit du sang de la même souris III, Exp. D, au 31<sup>e</sup> jour ; le 4<sup>e</sup> jour de l'infection, elle sert à inoculer sous la peau 4 souris dont trois reçoivent, le lendemain, du Spirille dans le péritoine. Le tableau suivant résume la marche de l'infection.

DATES	SOURIS I		SOURIS II		SOURIS III		TÉMOIN
	Trypan.	Spirilles	Trypan.	Spirilles	Trypan.	Spirilles	
I tryp. 5h. ½ soir							
1 Sp. 1 <sup>er</sup> j. 6h.							
2 <sup>e</sup> —	TR	R	R	TR	TR	TR	R
3 <sup>e</sup> —	N	N	N	N	AN	TR	N
4 <sup>e</sup> —	TN	TN	TN	TN	TN	N	TN
5 <sup>e</sup> —	+ (4 <sup>e</sup> -5 <sup>e</sup> )		EN	O	EN	O	+ (4 <sup>e</sup> -5 <sup>e</sup> )
6 <sup>e</sup> —			+ (1 h.)		N	O	
7 <sup>e</sup> —					O	TR	
8 <sup>e</sup> —					O	AN	
9 <sup>e</sup> —					O	TR	
10 <sup>e</sup> —					TR	TR	
11 <sup>e</sup> —					NR	NR	
					A cette date, traitée par Atoxyl.		

3. — Avec le témoin de l'expérience précédente, 3 souris sont inoculées sous la peau et deux d'entre elles reçoivent, le lendemain, des spirilles dans le péritoine.

Le témoin meurt en 3 jours 1/2 avec des Trypan. nombreux.

L'une des souris succombe en 2 jours avec des Trypan. très nombreux et des spirilles rares ; l'autre en 4 jours 1/2, avec des Trypan. très nombreux et des spirilles assez nombreux.

En résumé, de ces 8 souris, une seule a résisté quelque temps ; chez les sept autres, les spirilles n'ont eu aucune action.

Des expériences précédentes, il découle que si les Trypan.

ont acquis, contre les produits solubles par lesquels les spirilles sont capables de les influencer, une vaccination qui persiste à travers plusieurs passages par souris, cette vaccination n'est pas constante.

Nous nous sommes jusqu'ici efforcé de montrer l'action des spirilles sur les Trypan., mais il n'est pas douteux que ces derniers exercent également une action sur les spirilles.

Ainsi, nous avons vu des animaux présenter trois récidives de spirilles, la dernière 29 jours après l'infection (souris I et III, de l'Exp. D), fait jusqu'alors inconnu dans l'infection pure à spirilles.

Nous avons aussi signalé, et nous y insistons ici, que les animaux les plus résistants de nos expériences ont généralement présenté une évolution anormale de la spirillose.

En observant attentivement tous les cas, il nous a paru que Trypan. et spirilles exercent une action réciproque les uns sur les autres, qu'ils se gênent mutuellement, qu'ils se font une sorte de concurrence vitale. Ce n'est d'ailleurs là, nous ne le dissimulons pas, qu'une constatation de fait, et non une explication du phénomène.

La manière dont les inoculations sont faites paraît avoir une grande importance; la série de nos expériences nous montre, en effet, que :

1. — Chez les souris guéries de spirillose, le Nagana évolue sans modifications;

2. — Chez les souris inoculées d'abord de spirilles, puis de Trypan., on ne constate pas de régression des Trypan.; il y a seulement un léger retard dans la mort des animaux;

3. — Chez les souris inoculées en même temps de spirilles et de Trypan., la survie est plus longue que dans le cas précédent, et les Trypan. subissent une régression;

4. — Chez les souris inoculées d'abord de Nagana sous la peau, puis le lendemain de spirilles dans le péritoine, la survie a été la plus longue.

#### TICK-FEVER ET SURRA.

Nous n'avons fait, sur cette association, qu'un très petit

nombre d'expériences : les animaux se sont comportés comme ceux inoculés de Spirilles et Nagana, avec cette seule différence que la mort survenait à des époques plus éloignées, du fait de la moindre virulence du Surra (virus de l'île Maurice du Dr Lafont) pour la souris.

#### TICK-FEVER ET DOURINE.

L'évolution de la Dourine (virus Rouget 1904) chez la souris n'a pas la précision ni la rapidité de celle du Nagana ; nous nous bornerons donc ici à résumer brièvement les observations faites au cours de nos expériences.

L'inoculation de Spirilles, pratiquée quatre jours après celle du Trypan., a donné des survies variant de 9 à 29 jours (dans une expérience actuellement en cours ; deux souris, inoculées depuis un mois et demi, ne présentent qu'une petite quantité de Trypan.).

L'inoculation de Trypan., faite pendant l'infection à Spirilles, n'a donné aucun résultat : la Dourine a évolué normalement.

Des inoculations, faites en mélange dans le péritoine à 4 souris, ont permis de conserver 3 des animaux plus de 2 mois ; ils sont encore vivants et, seul, l'un d'eux a présenté, le 41<sup>e</sup> jour, quelques rares Trypan. Le 4<sup>e</sup> est mort le 24<sup>e</sup> jour, avec des Trypan. nombreux.

Nous avons constaté plusieurs fois, dans l'infection mixte, une troisième récidive de Spirilles, environ 4 mois après l'inoculation.

Chez une souris inoculée de Spirilles depuis 20 jours, et semblant guérie, il est fait une inoculation de Dourine : le 29<sup>e</sup> jour, les Spirilles réapparaissent pendant 3 jours.

#### TICK-FEVER ET TRY PAN. GAMBIENSE.

Nous avons expérimenté chez la souris, le rat blanc et le cobaye. Nous transcrivons simplement les observations suivantes, forcément non concluantes, car l'affection à *gambiense* est longue, irrégulière chez ces animaux.

Chez la *souris*, l'inoculation de Spirilles 15 jours après celle de Trypan. fait rapidement tomber les Trypan. à 0, alors que les témoins en présentent une quantité notable. 3 mois 1/2 après le début de l'infection, les Trypan. sont nombreux ou non

rares chez les témoins; les souris ayant reçu des Spirilles n'en présentent plus. Cependant elles ne sont pas guéries, car l'inoculation d'une grande quantité de leur sang à un animal neuf lui donne une infection sûre.

Chez une souris spirillée, l'inoculation de Trypan. donne une évolution, qui paraît normale, de la maladie à *gambiense*.

Chez les *rats blancs*, il est difficile de se rendre compte de l'action des Spirilles, l'infection à Trypan. subissant normalement des régressions nombreuses et variées.

Quatre *cobayes* ont été infectés de Trypan. Au bout de 2 mois, des Spirilles sont inoculés à deux d'entre eux : les Trypan. tombent à 0 presque immédiatement, bien que l'infection à Spirilles ait été très légère. Les témoins ont toujours présenté des parasites.

Les animaux, non guéris, sont encore actuellement vivants.

#### TICK-FEVER ET TRYPAN. LEWISI.

A plusieurs rats présentant une infection intense à *Trypan. lewisi*, M. Mesnil a inoculé dans le péritoine le Spirille de la *tick-fever*. Dans aucun cas, malgré le résultat positif de l'inoculation spirillaire, il n'y a eu action sur les Trypan. qui ont persisté encore longtemps en grand nombre comme chez les témoins.

Ce fait est à rapprocher de l'action nulle des divers médicaments, actifs vis-à-vis des Trypan. pathogènes des mammifères, sur le *Trypan. lewisi*. MM. Laveran et Mesnil<sup>1</sup> l'ont établi pour le sérum humain, l'arsénite de soude et le trypanroth. M. Mesnil (recherches inédites) n'a pu non plus obtenir d'action avec les meilleures des couleurs de benzidine étudiées par M. Nicolle et lui-même, pas plus qu'avec l'atoxyl ou son dérivé acétylé.

#### CONCLUSIONS.

1<sup>o</sup> L'infection mixte à Spirilles et Trypan. modifie la marche des deux infections simples;

2<sup>o</sup> En général, chaque fois que reparaissent les Spirilles, les Trypan. régressent, chez les animaux résistants;

3<sup>o</sup> Cette régression périodique des Trypan. entraîne une survie notable des animaux infectés;

1. LAVERAN et MESNIL, *Trypanosomes et Trypanosomiases*. Paris, Masson, p. 95.

4<sup>o</sup> L'infection mixte amène l'apparition, à des dates particulièrement éloignées, de nouvelles infections à Spirilles;

5<sup>o</sup> L'explication de la survie ne peut être cherchée dans une atténuation de virulence du Trypan.;

6<sup>o</sup> L'action des produits solubles émanant des Spirilles vivants pourrait peut-être expliquer en partie le retard de la mort par Trypan., car ces Trypan. montrent un certain état de vaccination contre de nouveaux Spirilles;

7<sup>o</sup> Les produits solubles des Spirilles morts n'ont aucune action sur les Trypan.;

8<sup>o</sup> La manière dont les deux inoculations sont pratiquées importe beaucoup. C'est l'inoculation de Spirilles dans le péritoine faite un jour après celle des Trypan. sous la peau, qui paraît donner les meilleurs résultats pour le Nagana.

Institut Pasteur, 14 juillet 1907.

---

# Sur des régions paludéennes prétendues indemnes d'Anophélines en Algérie

PAR LES DRS EDMOND SERGENT ET ÉTIENNE SERGENT

Au cours de l'hiver dernier, M. le Pr Kelsch s'est élevé contre le soi-disant absolutisme de la doctrine anophélienne dans trois intéressantes communications à l'Académie de Médecine<sup>1</sup>.

Sur deux points, l'éminent savant obtiendra d'unanimes suffrages :

En premier lieu, lorsqu'il demande que la prophylaxie du paludisme basée sur les découvertes récentes ne fasse pas oublier les anciennes pratiques qui ont, en somme, pour but le renforcement de la résistance des organismes infectés, par l'amélioration des conditions hygiéniques générales.

En second lieu, il est évident que la connaissance de l'étiologie anophélienne n'implique pas la négation de la possibilité d'une autre étiologie. Celle-ci ne peut être ni affirmée ni infirmée. On sait que la doctrine anophélienne dit la vérité ; mais on peut, on doit se demander si elle la dit tout entière.

Toutefois, l'existence d'un mode de propagation autre que la piqûre de Moustiques infectés, jusqu'à ce qu'elle soit prouvée par des faits bien établis, doit rester l'objet d'un doute provisoire.

M. le Pr Kelsch apporte de nombreux documents bibliographiques pour démontrer l'insuffisance de la doctrine anophélienne. Parmi tous ces arguments, nous n'en avons trouvé qu'un nouveau, original et inédit, qui fût de nature à faire supposer l'intervention d'un facteur inconnu.

Il a trait à l'absence d'Anophélines de régions paludéennes. M. le Pr Kelsch écrit<sup>2</sup> : « J'extrais d'une lettre, — elle me vient de l'inspecteur général, directeur du service de santé de l'Algérie et de la Tunisie, — le passage suivant : « Nous avons « eu récemment une recrudescence très accusée du paludisme à

1. *Bull. Ac. méd.*, 3<sup>e</sup> s., t. LVI, 1906, p. 206 (2 octobre), p. 343 (30 octobre), p. 615 (26 décembre). Réponses de M. LAVERAN : p. 270 (16 octobre) et p. 31 (4 décembre).

2. *Bull. Ac. méd.*, 3<sup>e</sup> s., t. LVI, 1906, p. 350.

« Batna et à Lambèse, et on n'a pu trouver un seul Anophèle « parmi les moustiques capturés au cours de la saison. » Il me paraît difficile de récuser ce témoignage émanant de médecins instruits, attentifs, consciencieux et pénétrés de la haute importance attachée à la solution de la question en litige. »

Nous avons effectué, dès que la saison l'a permis, durant la seconde quinzaine de juillet 1907 (période préépidémique à cette altitude de 1,000 mètres) une enquête sur cette recrudes cence du paludisme à Lambèse et à Batna en 1906.

Deux questions préalables se posaient :

- 1<sup>o</sup> L'épidémie de 1906 était-elle bien due au paludisme?
- 2<sup>o</sup> Les cas étaient-ils contractés dans ces deux localités, ou y étaient-ils importés?

Les témoignages de nos distingués confrères M. Bruncher, médecin de la Maison centrale, MM. Jeandidier et Massenet, médecins-majors aux zouaves, permettent d'affirmer qu'il s'agissait bien de paludisme autochtone.

Ce point établi, nous avons procédé à notre enquête suivant notre méthode habituelle : par la recherche du réservoir de virus et des gîtes à Anophélines.

*Réservoir de virus.* — Le procédé d'évaluation de l'importance du *Réservoir de virus* que nous préconisons consiste à établir le pourcentage des grosses rates paludéennes chez les indigènes (surtout les enfants). Ce pourcentage constitue l'index endémique.

A Lambèse, l'index endémique printanier est le suivant :

1<sup>o</sup> Indigènes du village :

Enfants	{	de 0 à 5 ans	8 grosses rates	sur 31 examinés	{	22 sur 84
		6 à 10 —	10	=	30	=
		11 à 15 —	4	=	23	=

Adultes..... 4 — 8

La forte proportion des grosses rates chez les enfants : 26,1 0/0, montre bien que le paludisme est endémique à Lambèse, ce qui confirme les observations de M. le Dr Bruncher ;

2<sup>o</sup> Détenus de la Maison centrale :

Parmi eux un grand nombre reviennent de chantiers malsains. Tous adultes.

19 porteurs de grosses rates sur 320 examinés.

Le sang d'un indigène des douars voisins, examiné en plein accès, nous a montré le parasite de la tierce maligne.

*Gîtes à Anophélines.* — A LAMBÈSE, dans la Maison centrale même, nous avons trouvé des *Anopheles maculipennis*, femelles hiverneuses<sup>1</sup>. Depuis notre passage, M. Nérat, directeur de la Maison centrale, qui a appris à les reconnaître, en capture facilement dans son appartement, à quelques mètres du casernement des zouaves.

Les gîtes à larves principaux sont actuellement : 1<sup>o</sup> l'oued Taguescrit, en amont du village, et, surtout, 2<sup>o</sup> l'oued Boukhabouza, de 700 à 1,000 mètres de la Maison centrale. Ce dernier oued est sec tout l'été en temps normal. Mais l'abondance des pluies et de la neige durant les hivers 1905-06 et 1906-07 l'ont fait couler durant tout l'été en 1906 et le feront couler en été 1907 (observations de M. Giner, adjoint au maire et propriétaire le long de cet oued). Il y a une coïncidence remarquable entre l'apparition anormale de l'eau dans cet oued et la recrudescence de l'épidémie de 1906.

Par contre, il n'y a aucune coïncidence entre cette épidémie et les fouilles archéologiques dans les ruines de Lambèse, que l'on avait incriminées en 1906 et même fait suspendre. En effet, M. le directeur de la Maison centrale constate, dans un rapport officiel, que les fouilles ont lieu tous les ans au même endroit, depuis dix ans, et c'est seulement en 1906 qu'a sévi fortement le paludisme.

A BATNA, les gîtes à Anophélines sont constitués par l'oued Batna lui-même. De jeunes larves d'*Anopheles maculipennis*, provenant de la première ponte des femelles hiverneuses, ont été trouvées dans cet oued au sud et au sud-ouest de la ville, à 700 mètres environ du camp. Des Anophèles adultes ont été trouvés en pleine ville (en face de l'église).

\*\*\*

La question est donc résolue : ni à Batna ni à Lambèse on

1. Le fait de rencontrer des femelles *hiverneuses* démontre bien l'existence, en 1906, d'Anophélines dans la même localité.

ne constate une exception à la loi de Grassi : pas de paludisme sans anophélisme.

Nous nous permettrons une observation en terminant : M. le Pr Kelsch rend hommage au savoir et à la conscience des médecins qui ont opéré la première enquête, à résultats négatifs. Personne, en effet, n'ignore ce que la science et la nosographie algérienne en particulier doivent au glorieux corps des médecins de l'armée d'Afrique, dont M. le Pr Kelsch est un des plus vénérés représentants ; mais, en l'espèce, la recherche des Anophélines, dont les mœurs diffèrent de celles des autres Moustiques, n'est pas œuvre de médecin, mais œuvre d'entomologue spécialiste.

---

# Analyse de quelques mélanges d'acides gras volatils

PAR M. A. LASSEUR.

---

Plusieurs procédés ont été employés pour la séparation et le dosage des mélanges d'acides gras volatils. Basés, les uns sur la distillation fractionnée (Liebig et Duclaux), les autres sur la transformation en sels de solubilités ou de formes cristallines différentes (sels de calcium, de baryum ou de guanidine), ces procédés ont paru longs et incertains, appliqués à des mélanges de plus de deux acides.

De tels mélanges se rencontrant parfois dans les produits de fermentations, j'ai pensé qu'il serait utile d'apporter une contribution à leur analyse.

Dans ce but, j'ai étudié quelques mélanges de trois ou quatre des acides gras volatils les plus simples, au moyen d'une méthode basée sur ce fait que : les acides formique et acétique ne sont pas enlevés de leurs solutions aqueuses étendues par agitation répétée avec le benzène ou le toluène ; tandis que les acides butyriques (normal et iso) et valériques (normal et iso) passent, au contraire, en totalité dans le carbure.

Les mélanges de trois ou de quatre de ces acides peuvent ainsi, par agitation répétée avec le benzène, être séparés en deux solutions : *a*) une solution aqueuse renfermant les acides formique et acétique ; *b*) une solution benzénique renfermant les acides butyriques et valériques.

Une partie de la solution aqueuse *a*) est traitée ensuite par la méthode de distillation fractionnée de Duclaux, afin de connaître la nature de l'acide ou des acides qu'elle renferme. Une autre partie de la même solution sert à leur dosage après transformation en sels de baryum.

On enlève au benzène les acides qu'il a dissous en l'agitant avec un léger excès d'eau de baryte. Après séparation, la solution alcaline acidifiée par l'acide phosphorique est soumise à la distillation, ce qui permet de recueillir les acides volatils en solution aqueuse.

Cette dernière solution est enfin traitée comme la première (distillation fractionnée et transformation en sels de baryum).

Ce procédé est applicable aux mélanges renfermant les

acides isobutyrique et valérique normal, puisque, ainsi que je l'ai montré antérieurement<sup>1</sup>, ils peuvent se différencier des autres acides gras volatils, au moyen de la méthode de Duclaux. Au contraire, il est inapplicable à ceux renfermant de l'acide propionique, celui-ci étant presque également soluble dans l'eau, le benzène ou le toluène.

Je me suis assuré que les divers traitements indiqués n'altèrent en rien les acides étudiés, et que les nombres fournis par la distillation fractionnée suivant la méthode Duclaux sont bien ceux qui les caractérisent.

La transformation des acides en sels de baryum permet d'effectuer leur dosage de la façon suivante :

Un volume connu de la solution acide est, après neutralisation par l'eau de baryte, évaporé, desséché et pesé. Soit  $P$  ce poids.

On transforme ensuite ce résidu en sulfate, qui par calcination donne le poids de baryum contenu dans le volume employé. Soit  $P'$  ce poids.

Si  $x$  et  $y$  sont les poids des deux sels de baryum obtenus, la 1<sup>e</sup> pesée donne :

$$x + y = P.$$

Si  $M$  et  $M'$  sont les poids moléculaires de ces deux sels, la 2<sup>e</sup> pesée donne :

$$\frac{x}{M} + \frac{y}{M'} = \frac{P'}{137}.$$

Ces deux équations donneront les valeurs de  $x$  et  $y$ , qui permettront de passer à celles des deux acides correspondants. En effet si  $\mu$  et  $\mu'$  sont les poids moléculaires de ces acides, leurs valeurs seront données par les expressions suivantes :

$$x = P' \left[ \frac{2 \mu' M'}{137 (M' - M)} \right] - P \frac{2 \mu}{M' - M}.$$

$$y = P \frac{2 \mu}{M' - M} - P' \left[ \frac{2 \mu' M}{137 (M' - M)} \right].$$

On voit que les valeurs de  $x$  et de  $y$  seront obtenues avec

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, janvier 1907.

d'autant plus d'approximation que les poids moléculaires des sels de baryum correspondants seront différents.

Voici quelques exemples de dosages obtenus par ce procédé :

MÉLANGES	TENEUR PAR LITRE		
	Mis.	Trouvé.	Différence.
Acide acétique.....	3 gr. 225	3 gr. 160	0 gr. 06
— butyrique.....	4 gr. 440	3 gr. 760	0 gr. 60
— isovalélique .....	5 gr. 630	5 gr. 200	0 gr. 43
Acide formique .....	4 gr. 174	3 gr. 463	0 gr. 71
— acétique.....	4 gr. 836	4 gr. 422	0 gr. 74
— butyrique .....	3 gr. 960	4 gr. 230	0 gr. 27
— isovalélique .....	6 gr. 487	7 gr. 046	0 gr. 52
Acide formique .....	2 gr. 834	2 gr. 793	0 gr. 04
— acétique .....	1 gr. 624	1 gr. 853	0 gr. 22
— isobutyrique.....	6 gr. 776	6 gr. 460	0 gr. 61
— valérique normal .....	5 gr. 694	5 gr. 370	0 gr. 32

